UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**USO DE TÉCNICAS DE PROTEOMA E GENOMA FUNCIONAL
PARA REVELAR AS BASES MOLECULARES DA AÇÃO
ANTI-TUMORAL DE ÁCIDO RETINÓICO**

WAGNER RICARDO MONTOR

Orientadora: Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica**

SÃO PAULO - 2005

"A ciência humana consiste mais em destruir erros
do que em descobrir verdades"
(Sócrates)

Aos meus pais (Osmar e Terezinha), pelo apoio constante e incondicional...

À minha irmã Rosi, por tudo que é...

Ao meu querido sobrinho Fabio (Bito), por todos os momentos de descontração...

AGRADECIMENTOS

À professora Mari Cleide Sogayar, que ao longo de todos estes anos me orientou, generosamente compartilhando comigo sua preciosa experiência profissional e pessoal, me dando condições para alcançar novos horizontes.

À professora Anna Carla Goldberg, por seu apoio e amizade.

A todos os colegas e amigos do LBCM e UIPH, por todos os momentos sempre muito intensos proporcionados.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a crescer durante este período.

Aos professores, colegas e funcionários do Instituto de Química da USP, pelo apoio, atenção e amizade.

Aos amigos que estiveram presentes e tiveram paciência comigo, todas as vezes em que eu perdi a paciência com todos.

Ao amigo Marcos Demasi, pelo companheirismo e compartilhamento de idéias e protocolos ao longo desta caminhada.

Aos amigos Milton Uehara, Ryan Driskell, Ricardo Vila, Theri Degaki, Karin Krogh, Fernanda Festa, Fernanda Ortis, Leonardo Rodrigues, Sheila Brochado e Fernando Abdulkader pelo constante apoio e amizade.

Às pessoas com quem tive o prazer de trabalhar mais diretamente, compartilhando idéias e momentos de descontração: Marcos, Gabi, Theri, Ana Paula, Fernanda Festa, Luciana Cruz e Letícia.

A todos aqueles que já se foram do laboratório, mas cuja amizade ficou, independente da distância, como as insuperáveis Fernanda Ortis, Lucia Helena e Maki.

Ao Mário e ao Christian, por todas as discussões sobre o indiscutível, que me fizeram aprender que sempre pode existir uma visão diferente (muito diferente) para qualquer coisa.

Ao Antero, pela rica troca de conhecimentos quase nunca científicos, nos longos períodos de trabalho no fluxo laminar e à Rita, pelas rápidas participações.

À minha única e preferida aluna de Iniciação Científica Gabriela (Pipoca), por toda a ajuda e gargalhadas.

À Áurea por toda paciência e ensinamentos.

Ao Christian por me ajudar sempre que possível.

Ao Laboratório do Professor Camargo do Instituto Butantan, em especial ao Daniel Pimenta, pelo trabalho com o MALDI-TOF.

Ao corpo técnico do LBCM e UIPH (Zizi, Irenice, Patrícia, Débora, Sandra, Ricardo, Cacá, Helena e Luana), pelo apoio.

Aos colegas e professores do curso de Proteoma do Cold Spring Harbor Laboratory, pelas ricas discussões.

A tudo e a todos do grupo Auta de Souza, por me ajudarem a me reencontrar nos momentos mais difíceis.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP – *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*

CNPq – *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*

FINEP – *Financiadora de Estudos e Projetos*

CABBIO – *Centro Argentino Brasileiro de Biotecnologia*

ABREVIações

2D-PAGE	Eletroforese Bidimensional
ACN	Acetonitrila
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
AP-1	"Activator Protein 1"
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATRA	Ácido Retinóico All-trans
cDNA	DNA complementar
CFU	"Colony Forming Unit"
CHAPS	"(3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonate"
CIAP	"Calf Intestine Alkaline Phosphatase"
cpm	Contagem Por Minuto
CRABP	"Cellular Retinoic Acid Binding Protein"
CRBP	"Cellular Retinoid Binding Protein"
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenedinitrilotetracético, sal dissódico
EST	"Expressed Sequence Tag"
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GC	Glicocorticoide
GFAP	"Glial Fibrillary Acidic Protein"
GRP78	"Glucose Regulated Protein"
HEPES	Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etano-sulfônico
hK2	"Human Kallicrein 2"
Hsc70	"Heat Shock cognate 71kDa protein"
IL	Interleucina
kDa	Kilo Daltons
LB	meio de Luria-Bertani
LEDGF	"Lens Epithelium-Derived Growth Factor"
MALDI-TOF	"Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight"
MOPS	3-[N-Morpholino] Propanosulfonic Acid
NGF- γ	"Nerve Growth Factor - γ "
OD	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de base
PBSA	"Phosphate Buffered Saline"
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	"Protease Inhibitor"
PLP	"Proteolipid Protein"
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoreto
RAR	Receptor de Ácido Retinóico
RBP	"Retinoid Binding Protein"

RDA	"Representational Difference Analysis"
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
RXR	Receptor de Ácido Retinóico
SAGE	"Serial Analysis of Gene Expression"
SFB	Soro Fetal Bovino
SCGF	"Stem Cell Growth Factor"
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
Spi	"Serine Protease Inhibitor"
SSC	Solução Salina contendo Citrato
SSH	"Subtractive Suppressive Hybridization"
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCA	Ácido Tricloroacético
TCTP	"Translationally Controlled Tumor Protein"
TE	Tris-EDTA
TFA	Ácido Trifluoroacético
TNF- α	"Tumor Necrosis Factor - α "
TUNEL	"Terminal deoxytransferase-mediated deoxyuridine nick end-labelling"

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A glia e os gliomas	1
1.2. Modelos de estudo de glioma e a linhagem celular C6/ST1	5
1.3. Ácido Retinóico	8
1.4. Proteoma	11
1.5. Inibidores de Serina Protease (Serpinas)	16
2. RACIONAL	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Materiais	23
4.1.1. Plasmídeos	23
4.1.2. Construções geradas no presente trabalho	26
4.1.3. Linhagens celulares	27
4.1.4. Soluções e meios de cultura para células de mamífero	28
4.1.5. Meio de cultura e suplementos para bactérias	28
4.1.6. Isótopos radioativos	29
4.1.7. Reagentes	29
4.1.8. Material para eletroforese bidimensional	29
4.1.9. Soluções	29
4.2. Métodos	32
4.2.1. Cultivo celular	32
4.2.2. Eletroforese bidimensional	33
4.2.3. Clonagem dos genes de interesse	42
4.2.4. Geração de clones celulares e populações recombinantes	49
4.2.5. Análise comparativa da expressão gênica	52
4.2.6. Análise de fenótipo dos clones celulares e de populações recombinantes geradas	59
4.2.7. Análise estatística	61
5. RESULTADOS	62

5.1. Análise do efeito de ATRA em células ST1 através de técnicas de Proteoma	62
5.1.1. Geração de perfis bidimensionais de extrato total de células ST1 marcadas metabolicamente com metionina radioativa	62
5.1.2. Geração de perfis bidimensionais das frações nucleares e citoplasmáticas de ST1	64
5.1.3. Análise dos perfis bidimensionais de extratos nucleares	67
5.1.4. Espectrometria de massa (<i>mass fingerprinting</i>) dos <i>spots</i> de interesse	71
5.2. Análise do efeito de ATRA em T98G através de técnicas de Proteoma	80
5.3. Análise do nível de expressão de serpinb6 e hPI (6) em linhagens celulares de glioma tratadas com ATRA	83
5.4. Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos genes de interesse	86
5.4.1. Amplificação da porção codificante completa e de um fragmento <i>antisense</i> de serpinb6 de rato	86
5.4.2. Clonagem da porção codificante completa de serpinb6 de rato em pENTR 2B	89
5.4.3. Clonagem da porção codificante completa de serpinb6 de rato e do fragmento <i>antisense</i> , em pLPCX	89
5.4.4. Amplificação da porção codificante completa e de um fragmento <i>antisense</i> de PI(6) humano	93
5.4.5. Clonagem da porção codificante completa e de um fragmento <i>antisense</i> de PI(6) humano	95
5.4.6. Seqüenciamento da construção pDEST12.2-serpinb6	96
5.4.7. Seqüenciamento das construções em pLPCX	97
5.5. Geração de populações celulares recombinantes para o estudo dos efeitos de serpinb6	99
5.5.1. Transfecção com construção plasmideal	99
5.5.2. Infecção com retrovírus recombinantes	101
5.6. Análise do fenótipo das populações celulares geradas por transfecção e infecção	105
5.6.1. Observação da morfologia das populações geradas	105
5.6.2. Curvas de crescimento em substrato sólido	108
5.6.3. Crescimento em suspensão de agarose	111
5.6.4. Ensaio de incorporação de timidina radioativa	116
5.6.5. Ensaio de MTT	118
6. DISCUSSÃO	120
6.1. Análise proteômica do efeito anti-tumoral de ATRA	120

6.1.1.	Implantação e padronização da metodologia proteômica de 2D-PAGE e MALDI-TOF _____	120
6.1.2.	Análise dos resultados obtidos por 2D-PAGE e MALDI-TOF no estudo do efeito de ATRA sobre células ST1 _____	124
6.1.3.	Análise dos perfis bidimensionais de T98G _____	131
6.2.	Análise da expressão de serpinb6 em linhagens celulares de glioma tratadas com ATRA_____	131
6.3.	Análise funcional de serpinb6_____	133
6.3.1.	Escolha do sistema de transferência gênica_____	133
6.3.2.	Obtenção das construções de interesse_____	134
6.3.3.	Análise das populações infectadas de células ST1_	135
6.3.4.	Análise dos transfectantes de T98G_____	139
7.	CONCLUSÃO _____	142
7.1.	Conclusões Parciais _____	142
7.2.	Conclusões Gerais_____	143
8.	BIBLIOGRAFIA _____	144

RESUMO

Controlar a proliferação celular de tumores é um objetivo que vem sendo perseguido há décadas, com moderado sucesso na maioria dos casos. Dentre os diversos tipos de tumores que atingem a humanidade, alguns gliomas são considerados os mais fatais, por haver pouca ou nenhuma alternativa de tratamento efetivo.

Agentes que apresentam propriedades anti-tumorais, como glicocorticóides (GC) e a forma *all-trans* do ácido retinóico (ATRA) são utilizados como adjuvantes no tratamento de alguns tipos de glioma. Entretanto, apesar de serem moléculas bastante conhecidas, pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação como anti-tumoral. Para endereçar este problema, nosso laboratório se propôs a isolar e caracterizar genes regulados por estes agentes, utilizando modelos celulares, como as linhagens C6 e ST1 de glioma de rato, e as linhagens T98G e A172 de glioma humano.

A linhagem C6 apresenta características de células transformadas e tumorais em cultura, e responde a GC, ou ATRA, com inibição de crescimento e achatamento celular. A linhagem ST1, variante derivado da C6, é hiper-responsiva ao tratamento com GC e, aparentemente, mais responsiva ao tratamento com ATRA, passando por um processo de completa reversão fenotípica tumoral-normal, devido ao expressivo aumento do tempo de dobramento, diminuição da densidade de saturação, recuperação da dependência de fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino e da dependência de ancoragem para proliferação e perda do potencial tumorigênico, além de sofrer alterações morfológicas, como um maior achatamento celular e reorganização em feixes paralelos, que a aproximam do fenótipo normal.

No presente trabalho buscou-se alterações moleculares induzidas por ATRA em células ST1, para melhor compreender a cascata de eventos desencadeada por ação deste fármaco. Em

paralelo foram realizados estudos da ação de ATRA sobre as células T98G, buscando-se correlacionar os dados obtidos em modelo celular murino com modelos humanos.

Para tanto, duas metodologias de estudo foram aplicadas: a) análise proteômica através de eletroforese bidimensional de proteínas (2D-PAGE), acoplada à espectrometria de massa (MALDI-TOF), para gerar perfis de expressão protéica na ausência e na presença de ATRA, permitindo comparação e identificação de proteínas moduladas no processo; b) construção de vetores plasmideais e retrovirais para super-expressar ou bloquear a expressão de um inibidor de serina protease de rato (serpinb6), descrito previamente no laboratório como estando potencialmente envolvido no processo de reversão fenotípica de ST1 induzido por ATRA.

A abordagem proteômica permitiu a identificação de sete proteínas potencialmente reguladas por ATRA no modelo celular ST1, como as proteínas envolvidas em proliferação celular (c-Fos e SCGF), as proteínas de citoesqueleto (actina e tubulina), as proteínas envolvidas em estresse celular (GRP78 e Hsc70) e a proteína TCTP, classicamente reprimida em processos de reversão do fenótipo tumoral.

O uso de construções plasmideais e retrovirais permitiu a obtenção de populações celulares que super-expressam serpinb6 e a análise de fenótipo destas células indicou que serpinb6 também pode ter função citoprotetora em células ST1, o que a coloca junto com as proteínas GRP78 e Hsc70 identificadas, evidenciando a importância desta classe de proteínas no processo estudado.

ABSTRACT

Control of tumor cell proliferation is an objective that has been pursued for decades, with modest or no success in the majority of the cases. Among the several kinds of tumors that develop in humans, some gliomas are considered the most fatal, due to the lack of alternatives for effective treatment.

Anti-tumor agents, such as glucocorticoids (GC) or *all-trans* retinoic acid (ATRA) are used in combination with other drugs in some glioma cases. However, besides being very known molecules, their anti-tumor mechanism is not completely understood.

In order to address this problem, our laboratory decided to isolate and characterize genes regulated by these agents, using cellular models, such as the C6 and ST1 rat glioma cell lines and the T98G and A172 human glioma models.

The C6 cell line is fully transformed and tumoral in culture and responds to GC or ATRA treatment, showing growth inhibition and cell flattening. The ST1 variant is hyper-responsive to the treatment with GC and, apparently, more responsive to the treatment with ATRA, when compared to C6. Upon treatment with these agents, it undergoes a complete tumoral to normal phenotypic reversion, characterized by an increase in doubling time, decrease of saturation density in culture, recovery of dependence of serum factors for proliferation and anchorage for colony formation, besides inability to form tumors in nude mice and morphological changes.

Here we present the efforts undertaken towards better understanding of the molecular changes induced by ATRA in ST1 cells.

Aiming at the correlation of the data obtained from a rat model with human models, all the studies were performed in parallel with the T98G human glioma cell model.

To this end, two study methodologies were applied:

a) proteomic analysis through bidimensional electrophoresis coupled to MALDI-TOF identification, to generate protein expression profiles in the presence and absence of ATRA, allowing comparison and identification of proteins modulated in the process; b) construction of plasmid and retroviral vectors to overexpress or block the expression of a serine protease inhibitor (serpinb6), previously described in the laboratory as being potentially involved in the process of tumoral to normal phenotypic reversion promoted by ATRA in ST1.

The proteomics approach allowed the identification of seven proteins potentially regulated by ATRA in ST1, such as the proteins involved in cell proliferation (c-Fos and SCGF), cytoskeleton organization (actin and tubulin), cellular stress (GRP78 and Hsc70) and the tumor related protein TCTP, classically repressed in tumoral to normal reversions, and related to the three groups of proteins mentioned above.

By using plasmid and retroviral vectors it was possible to obtain recombinant cell populations over-expressing serpinb6. The phenotype analysis of these populations indicated that serpinb6 can also have cell protection effects in ST1, which would classify it together with GRP78 and Hsc70 as an anti-stress protein highlighting the importance of this protein class in the process studied.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A glia e os gliomas

O tecido cerebral é composto por dois tipos principais de células: os neurônios e a neuroglia (ou glia). A glia, por sua vez, é formada por quatro tipos de células: astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos e microglia. Os primeiros representam 50% das células da glia, enquanto os outros tipos celulares representam, respectivamente 40%, 5% e 5% [1]. O conjunto das células da glia constitui 90% das células cerebrais em humanos e 65% em roedores [2].

Diversos trabalhos recentes mostram uma função dinâmica para a glia, diferente da função apenas de sustentação que lhe era atribuída no passado. Cada vez fica mais claro seu papel em processos como desenvolvimento neuronal [3, 4], manutenção da função dos neurônios maduros e regeneração do Sistema Nervoso Central (SNC) [5, 6]. Alguns detalhes do processo de comunicação entre glia e neurônios já são conhecidos, porém ainda existe muito a ser explorado [7, 8].

No processo de formação das células da glia, chamado de gliogênese, células primitivas do SNC geram células cada vez mais comprometidas com a formação das células maduras específicas. Classicamente, modelos de nervo óptico e medula espinal foram utilizados para descrever este processo, onde glioblastos dão origem a precursores de oligodendrócitos e de astrócitos. Os precursores de astrócitos originam os astrócitos do tipo 1 e os precursores de oligodendrócitos dão origem às células O2A, as quais são precursoras de oligodendrócitos maduros e astrócitos tipo 2 [9]. Estudos mostram a distribuição temporal da formação das células cerebrais, situando a formação da glia posteriormente à formação dos neurônios [10]. Marcadores moleculares específicos podem

identificar, de forma diferencial, algumas células precursoras e mesmo distinguir entre os astrócitos tipo 1 e 2 [11].

Os tumores de neuroglia, genericamente chamados de gliomas, apresentam diversos subtipos que incluem alguns dos tumores mais fatais que atingem a Humanidade [12-14].

Com exceção de alguns tumores cerebrais benignos, que são passíveis de ressecção e de alguns tipos de gliomas sensíveis à quimioterapia e/ou radioterapia, pode-se afirmar que não há cura para estes tipos de tumores. Geralmente são tumores não metastáticos, porém há relato de casos raros em que metástases já foram encontradas [15]. Todo o esforço das equipes de médicos e cientistas é frequentemente direcionado apenas para o prolongamento da vida dos pacientes acometidos por gliomas.

A utilização de uma terapia para a qual o tumor não responde não só permite o contínuo agravamento do quadro, como também debilita o paciente pela carga de substâncias tóxicas utilizadas sem benefício.

Alguns tratamentos paliativos utilizam hormônios do tipo glicocorticóide [16], ou ainda retinóides, como fármacos secundários [17, 18], especialmente no caso de recidivas.

Apesar destes tipos de tumores serem pouco diferenciados, ainda mantêm características que permitem sua classificação histológica, sendo este o método diagnóstico atualmente utilizado para escolha da terapia mais adequada e determinação do prognóstico [19]. Entretanto, a determinação do grau de malignidade pode variar com o observador, não garantindo a objetividade necessária para um diagnóstico preciso [20].

De acordo com a classificação histológica da Organização Mundial da Saúde (OMS), os gliomas difusos apresentam quatro subtipos com características de astrócito (astrocitoma pilocítico, astrocitoma grau II, astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme), dois subtipos com características de oligodendrócito

(oligodendroglioma grau II e oligodendroglioma anaplásico) e dois subtipos com características mistas de astrócitos e oligodendrócitos (oligoastrocitoma grau II e oligoastrocitoma anaplásico). Glioblastoma multiforme, a forma mais avançada, pode se originar de forma secundária, a partir de qualquer um dos tipos, ou mesmo se instalar como tumor primário, não passando pelos outros estágios [19].

A classificação histológica da OMS coloca em um mesmo grupo diversos tumores molecularmente distintos, por apresentarem características histológicas comuns. Esta classificação generalista mascara a individualidade molecular dos tumores, levando a equívocos na escolha da terapêutica mais adequada [21, 22].

A caracterização molecular dos tumores, permitindo a identificação de marcadores para diagnóstico e prognóstico e de marcadores de resistência à terapias, é a única maneira de abordar eficientemente esta doença, que se apresenta de forma tão heterogênea e complexa na clínica [23, 24].

Um estudo de microarranjos de cDNA, feito com 53 tumores astrocíticos humanos, permitiu a identificação de padrões de expressão de alguns grupos de genes que são característicos para cada subtipo, sendo o grupo correspondente a proteínas envolvidas com angiogênese o de maior valor para o diagnóstico diferencial dos gliomas neste estudo [25].

Utilizando a mesma técnica, outro estudo encontrou um grupo de 170 genes que foram utilizados, com sucesso, para a predição de classe e subtipo de glioma na população estudada [26, 27].

A disponibilidade de dados mais completos obtidos nos diversos projetos Genoma, e também nos bancos de SAGE, permite hoje a realização de trabalhos *in silico* para comparação do nível de expressão de genes de interesse entre diferentes bibliotecas, de forma virtual [28].

Como citado anteriormente, alguns retinóides, como a forma *all-trans* do ácido retinóico (ATRA) são utilizados como adjuvantes no tratamento de gliomas, especialmente em casos de recidivas.

Os retinóides foram inicialmente testados em diversas culturas de gliomas, onde apresentaram alta capacidade de inibição de crescimento em monocamada e suspensão [29, 30]. Esta observação fez com que retinóides passassem a ser utilizados em testes clínicos para este tipo de tumor [31-34].

Na clínica, os resultados não foram tão empolgantes quanto em cultura, pois ocorre o aparecimento de resistência [35]. Não se sabe se a resistência se dá pela indução de enzimas metabólicas que promovem a degradação do fármaco, ou pela seleção de clones resistentes.

Outro ponto a ser considerado em protocolos que utilizam altas doses de retinóides por longo período de tempo é o aparecimento de efeitos adversos, especialmente na pele e mucosas [34, 36].

Retinóides são agentes pró-diferenciação, e como os tumores são geralmente menos diferenciados, esta classe de fármacos vem sendo utilizada com o intuito de promover diferenciação e bloquear o crescimento de alguns tumores, especialmente os epiteliais, incluindo os tumores de cabeça e pescoço, e tumores não sólidos, como leucemias [37, 38].

A melhor eficiência destes fármacos é observada no tratamento de leucemia pró-mielocítica aguda [39, 40] acompanhado ou não de terapia com agentes citotóxicos [41, 42] e na prevenção de câncer de pele [43, 44].

Formulações especiais de retinóides, para liberação prolongada e em sítios específicos, também vêm sendo desenvolvidas [45], mostrando ser este um agente bastante promissor para o tratamento de alguns tipos de câncer.

O melhor conhecimento da ação dos retinóides sobre os tumores, poderia melhorar sua eficiência de tratamento, através do desenho de moléculas mais específicas [46, 47].

A utilização de ATRA em testes clínicos de diversos tumores e como adjuvante no tratamento de gliomas, mais o fato deste fármaco ser capaz de promover parada de crescimento na linhagem C6 de glioma de rato [48], levou-nos a buscar as bases moleculares de sua ação anti-tumoral.

1.2. Modelos de estudo de glioma e a linhagem celular C6/ST1

A utilização de modelos para o estudo de tumores específicos é de grande importância tanto nos estágios iniciais, quanto nos mais avançados das pesquisas sobre os aspectos moleculares destas alterações celulares, uma vez que estes sistemas controlados permitem a análise com número restrito de variáveis. Os modelos podem ser linhagens celulares ou animais geneticamente modificados, dependendo do tipo de pesquisa em curso [49].

Ultimamente, diversos modelos celulares para tumores cerebrais têm sido desenvolvidos, através de diferentes estratégias de manipulação genética, de modo a produzir as mesmas mutações conhecidas para tumores humanos. Com estes modelos torna-se possível discriminar mutações que têm relação direta com a origem do tumor, de mutações resultantes da progressão tumoral [50-52].

Alguns modelos celulares existentes foram gerados com a utilização de agentes mutagênicos inespecíficos, como substâncias químicas e radiação, ou foram obtidos por cultura primária de tumores detectados em animais, e também em humanos, na rotina clínica. A origem molecular destes modelos é geralmente obscura e seu estudo representa, de forma fiel, a problemática enfrentada pelos oncologistas para o tratamento dos tumores [53, 54].

O tratamento destes modelos celulares em cultura, com agentes potencialmente anti-tumorais é capaz de induzir o processo de reversão destas células tumorais para normais, ou pelo menos, alterar parâmetros de malignidade, fazendo com que se aproximem da normalidade, simulando o que ocorre nos pacientes nos casos de tratamento efetivo e servindo de modelo para o teste de novos fármacos [55-58].

Múltiplas abordagens podem ser utilizadas para o estudo de tumores através de modelos celulares. No caso de já se dispor de candidatos a oncogenes ou genes supressores de tumor responsáveis pelo fenótipo maligno de uma determinada linhagem celular, pode-se imaginar estratégias para corrigir especificamente os defeitos genéticos e observar como tais manipulações afetam o comportamento maligno destas células. Assim, por exemplo, anticorpos, substâncias químicas, mutantes dominante-negativos, ou inibição de expressão gênica através de técnicas como *antisense* ou RNA de interferência, são utilizadas para verificar se induzem a reversão fenotípica, inibem o crescimento, ou causam alguma alteração significativa no comportamento celular [59, 60]. No caso de células com mutações em genes supressores de tumor, a reposição de genes intactos deve ser feita para avaliar se a inativação destes genes contribui para o fenótipo maligno [61-64].

Em nosso laboratório, utilizamos como modelo para o estudo de gliomas, principalmente a linhagem celular ST1, a qual foi derivada da linhagem C6 de glioma de rato [53].

A linhagem polimórfica C6 foi obtida a partir de um glioma de rato induzido quimicamente com o agente mutagênico metilnitrosouréia. A linhagem C6 apresenta características de células transformadas e tumorais em cultura, e responde a GC, ou ATRA, com inibição de crescimento e achatamento celular. A linhagem ST1, variante derivado da C6, é hiper-responsiva ao tratamento com GC e, aparentemente, mais responsiva ao

tratamento com ATRA, passando por um processo de completa reversão fenotípica tumoral-normal, devido ao expressivo aumento do tempo de dobramento, diminuição da densidade de saturação, recuperação da dependência de fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino e da dependência de ancoragem para proliferação, além de perda do potencial tumorigênico, e alterações morfológicas, como um maior achatamento celular e reorganização em feixes paralelos, que a aproximam do fenótipo normal [55, 56]. O fato de ST1 não ser polimórfica como C6 também é uma vantagem para sua utilização como modelo celular.

Estudos mostram a capacidade de células C6 de expressar tanto marcadores moleculares de astrócitos quanto de oligodendrócitos, quando tratadas com AMPc ou ATRA, sugerindo sua semelhança com as células O2A [65].

Utilizando o modelo celular ST1, é possível analisar o efeito do tratamento com ATRA, visando encontrar moléculas que estejam presentes em apenas uma das condições, evidenciando tanto potenciais marcadores tumorais, quanto importantes alvos para terapia.

O modelo celular ST1 vem sendo estudado pelo nosso grupo nos últimos 20 anos, através de diferentes técnicas, com os objetivos acima citados [66, 67]. A maioria dos projetos desenvolvidos, se baseiam em técnicas de análise de RNA mensageiro, sendo esta uma das formas de fazer inferências sobre a expressão protéica em células e tecidos.

No presente trabalho, análise proteômica através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa foi utilizada para comparar os perfis de expressão protéica das células ST1 tratadas com ATRA com o aquele das células não tratadas, de modo a encontrar proteínas cuja expressão é regulada pelo tratamento. Em paralelo, as células de glioma humano T98G foram utilizadas com o mesmo objetivo.

Estes modelos celulares foram utilizados ainda, para transfecção e/ou infecção com construções específicas que modulam a expressão de um gene previamente identificado em nosso laboratório, como potencialmente envolvido no processo de reversão fenotípica tumoral-normal induzido por ATRA em ST1. Ensaio funcionais foram realizados para verificar alterações de comportamento nas populações celulares geradas.

1.3. Ácido Retinóico

Os retinóides naturais correspondem a uma classe de moléculas formadas pela junção de quatro unidades de isoprenóides na orientação cabeça-cauda. O termo vitamina A é utilizado para descrever os retinóides que qualitativamente têm a mesma atividade biológica do retinol, sendo o ácido retinóico um dos seus derivados. No caso dos seres humanos, toda a vitamina A é obtida através da alimentação, principalmente nas formas de retinil ésteres de retinol ou de carotenóides precursores. Apenas uma pequena parcela é absorvida na forma de retinol e ácido retinóico. Nas células do intestino, o retinil éster é hidrolisado a retinol, pela ação de hidrolases específicas. Através de reações enzimáticas, os carotenóides também são convertidos a retinol, e este retinol proveniente da alimentação, mais o proveniente da hidrólise de ésteres, é re-esterificado e empacotado com outros lipídios, na forma de quilomícrons. Os quilomícrons são transportados via linfa, sendo captados principalmente pelo fígado. No fígado, os retinil ésteres são convertidos novamente a acetato de retinol, o qual pode ser estocado nas células esteladas hepáticas, ou secretado para o sangue, onde se encontra ligado à proteína ligante de retinol (RBP) [68]

A vitamina A, necessária para a maior parte dos tecidos, é obtida por captura da RBP da circulação. O acetato de retinol é

então oxidado a retinal e, subsequente, a ácido retinóico pela ação de desidrogenases.

Tanto o acetato de retinol quanto o ácido retinóico são pouco hidrossolúveis, e permanecem ligados a proteínas específicas durante estas reações de oxidação. Estas proteínas são as proteínas ligantes de retinol (CRBP I, II e III) e as proteínas ligantes de ácido retinóico (CRABP I e II) [69].

Em humanos, a forma *all-trans* do ácido retinóico (ATRA) é o derivado de vitamina A que atua de maneira mais expressiva na modulação gênica, através da transativação dos receptores de ácido retinóico. Porém, outras formas isoméricas podem ser geradas, como o ácido retinóico 9-cis e o ácido retinóico 13-cis. Estas formas podem ser produzidas pelo metabolismo de carotenóides 9-cis e 13-cis, ou a partir da isomerização de ATRA [70]. A concentração plasmática de ATRA varia de 4 a 14nM.

Os receptores de ácido retinóico são membros da família dos receptores heterodiméricos nucleares não esteroídicos, possuindo atividades de ligação ao DNA e de transativação. Estes heterodímeros são formados por duas famílias de proteínas: RAR e RXR, sendo que cada uma destas famílias possui três diferentes membros (α , β e γ) e diversas isoformas. A família RAR se liga tanto a ATRA quanto ao ácido retinóico 9-cis, enquanto que a RXR se liga apenas ácido retinóico 9-cis [71, 72].

Além de formar dímero com RAR, a família RXR pode ainda se unir com outros receptores nucleares, como o do hormônio tireoideano e o receptor de vitamina D [73].

Cada complexo de receptores que se unem em heterodímeros parece desempenhar funções diferentes, o que é sugerido pelo fato dos transcritos de cada receptor possuírem uma distribuição espaço-temporal específica durante a embriogênese e também, no indivíduo adulto [74].

O fato de existirem diversos derivados diferentes do ácido retinóico, as múltiplas possibilidades de combinações de receptores e a interação com outras vias, tornam o estudo de sua via, bem como de seu mecanismo de ação como anti-tumoral, bastante complexos.

Diversos trabalhos já foram publicados listando genes regulados por ácido retinóico em diferentes sistemas. Estas listas comumente incluem genes envolvidos com metabolismo de retinóides, sua via de sinalização, e outros genes de funções bastante variadas, como fatores de transcrição, hormônios, receptores de neurotransmissores, moléculas de adesão e outros, evidenciando o amplo espectro de ação desta classe de moléculas [75-79].

Tem sido postulado que alguns dos efeitos de inibição de crescimento celular por ácido retinóico sejam devidos à sua capacidade de inibir a atividade do complexo AP-1 [80]. Entretanto, em alguns modelos celulares, o tratamento com ácido retinóico promove aumento da atividade deste complexo protéico classicamente descrito como estando envolvido na indução da proliferação celular [81].

Outros pontos do ciclo celular nos quais o tratamento com ácido retinóico pode atuar vêm sendo identificados [82]. Células da linhagem mielocítica e linfócitos B, quando são tratadas com ácido retinóico, sofrem diversas alterações em componentes do ciclo celular, tais como: redução da expressão de *c-myc*, redução da expressão das ciclinas A e E, aumento da expressão de p21 e redução da fosforilação de Rb [83]. Em células de neuroblastoma, o tratamento com ácido retinóico promove indução de p18, redução de ciclina D1 e redução de CDKs (quinases dependentes de ciclina) [84].

A redução da ciclina D1 pelo tratamento com ácido retinóico parece envolver um mecanismo específico de proteólise que é

induzido por ubiquitinação, sendo este um dos mecanismos que vêm sendo propostos como sendo responsáveis pelos efeitos anti-câncer de ácido retinóico, gerando um atraso na transição G1-S do ciclo celular e permitindo reparo do DNA mutageneizado antes da progressão no ciclo [85, 86].

Nem mesmo sobre a dose a ser utilizada nos tratamento há um consenso. Apesar de altas concentrações de retinóides (1 a 10 μ M) serem utilizadas no tratamento de diversos tumores, doses muito menores de ATRA, da ordem de 100 a 500nM, se mostraram eficientes para o tratamento de meduloblastoma, sendo capazes de induzir apoptose por ativação de caspase-3 [87].

Mesmo conhecendo alguns dos componentes envolvidos com a sinalização dos retinóides, o conhecimento completo das vias que envolvem a ação destas moléculas, ainda está longe de ser alcançado [88]. Este conhecimento permitiria o desenho racional de fármacos mais específicos que atuassem apenas em algumas vias de interesse, diminuindo assim os efeitos adversos tão comuns nos tratamentos com este fármaco [89-91].

1.4. Proteoma

Na última década, pode-se observar um grande avanço na área de Biologia Molecular, com o desenvolvimento dos diversos Projetos Genoma [92-95]. Entretanto, ao contrário do que muitos esperavam, as informações geradas nestes projetos, não foram suficientes para decifrar o funcionamento das células, ou mesmo identificar todos os genes existentes, mas serviram de base para a formulação de novas questões. Para responder estas questões, surgidas neste período conhecido como “Era Pós-Genômica”, metodologias clássicas como a eletroforese bidimensional, cromatografias e técnicas baseadas em marcação com anticorpos, vêm sendo associadas com técnicas modernas, que permitem a identificação de proteínas por espectrometria de massa, de diversos

tipos, por exemplo. A estes estudos, cujos objetivos são descrever as proteínas em seu contexto, através da determinação de estrutura, modificação pós-tradução, localização celular, interação com outras moléculas e expressão relativa, deu-se o nome de Proteoma [96-98].

Proteoma não é uma técnica, mas um conceito que envolve dezenas de técnicas e metodologias diferentes e complementares [99].

Estudar proteínas envolve dificuldades que não estão presentes no estudo dos ácidos nucléicos, uma vez que a diversidade de estruturas possíveis para estas é bem maior do que para o DNA e o RNA, devido à maior variedade de possíveis unidades formadoras nas proteínas, sendo pelo menos vinte tipos de aminoácidos, contra apenas quatro tipos de nucleotídeos diferentes. Esta diferença de diversidade faz com que as moléculas de ácido nucléico sejam físico-quimicamente muito uniformes, comportando-se da mesma forma frente a qualquer técnica aplicada. Já as proteínas, se agrupam em diversas classes de estruturas que podem ser físico-quimicamente muito distintas, devendo haver uma adequação da técnica para o estudo de cada classe, o que dificulta a automatização e a realização de estudos em larga escala.

Com base nesta dificuldade, o estudo do RNA mensageiro como base de inferência para proteínas, em projetos chamados de Transcriptoma, vem sendo realizado [100]. Porém, a abundância relativa de RNA mensageiro nem sempre se correlaciona perfeitamente com a abundância protéica relativa [101]. Além disso, a seqüência primária pouco informa sobre a localização celular ou modificações pós-traducionais, e ainda, algumas amostras biológicas importantes e de interesse, para diagnóstico, não contêm RNA, como é o caso do líquido cefalorraquidiano e do líquido amniótico [102, 103].

Recentemente, um progresso importante pode ser visto no campo da Proteômica, com o desenvolvimento de métodos alternativos para separação e identificação de proteínas. Exemplos destes avanços são: tecnologias baseadas em *chips*, nos chamados *arrays* de proteína [104], a análise direta de complexos protéicos por espectrometria de massa [105, 106], o uso de *tags* de afinidade [107], sistemas como duplo híbrido em levedura [108], entre outros.

Entre todas as técnicas de Proteoma de uso atual, a mais utilizada é a eletroforese bidimensional (2D-PAGE), acoplada a espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. O principal requisito para todas estas técnicas é que seja possível separar, visualizar e analisar de forma reprodutível, misturas complexas de proteínas, obtidas a partir de células, tecidos ou organismos.

A eletroforese bidimensional utilizando matriz gelificada, assim como é utilizada atualmente, foi desenvolvida por O'Farrell, em 1975 [109], para a separação de proteínas de *Escherichia coli*, permanecendo até hoje como a técnica central utilizada nos diversos projetos Proteoma, devido à sua alta resolução, possibilidade de visualização e relativa facilidade de identificação das proteínas [110].

Esta técnica é chamada de bidimensional porque separa as proteínas de uma mistura complexa com base em dois parâmetros: carga elétrica (ponto isoelétrico), na chamada isoeletrofocalização, ou primeira dimensão; e tamanho (massa molecular relativa), na segunda dimensão.

A isoeletrofocalização consiste em separar as proteínas pelo seu ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico de uma proteína é o valor de pH no qual a sua carga elétrica líquida é zero. A carga líquida das proteínas varia de acordo com o pH do meio onde ela se encontra porque o pH do meio determina o nível de protonação das cadeias laterais dos aminoácidos. A carga líquida da proteína é zero quando

há um equilíbrio absoluto entre as cargas elétricas das cadeias laterais dos aminoácidos que a formam.

Quando a mistura de proteínas a ser analisada é aplicada sobre uma fita de poliacrilamida contendo variações de pH em gradiente e esta fita é submetida a um campo elétrico, as proteínas migram até encontrarem a região da fita em que o pH corresponde ao seu ponto isoelétrico e aí se depositam, desde que as proteínas não estejam solubilizadas em tampão contendo detergentes com carga, um cuidado importante a ser tomado [111].

Um avanço importante na técnica de isoeletrofocalização foi obtido com a possibilidade de imobilização do gradiente de pH de forma regional na fita de poliacrilamida utilizada para a primeira dimensão. Esta imobilização é feita através do acoplamento químico entre a poliacrilamida e moléculas orgânicas pequenas e carregadas, chamadas de anfolitos. Desta forma, o gradiente de pH é mantido durante toda a isoeletrofocalização, garantindo maior reprodutibilidade, o que não era possível quando anfolitos livres eram utilizados [110].

Após a primeira dimensão, a fita é equilibrada em tampão contendo SDS, para que as proteínas isoeletrofocalizadas adquiram carga negativa sendo, então, submetida à segunda dimensão, que ocorre exatamente como uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), com a única diferença de que a fita isoeletrofocalizada é colocada horizontalmente no lugar onde seriam aplicadas as amostras.

Após a separação, as proteínas do perfil bidimensional são coradas, os perfis são escaneados em equipamentos específicos (escaner de transmitância de braço duplo) e a análise comparativa pode ser feita de forma manual ou semi-automática com o auxílio de programas específicos.

A identificação das proteínas de interesse é geralmente feita através de espectrometria de massa, sendo a espectrometria de

massa do tipo MALDI-TOF a mais comumente utilizada, embora diversas outras existam [97]. Para a realização desta técnica, as proteínas contidas em um único *spot* excisado do gel, são descoradas e digeridas com tripsina *in gel*, gerando os fragmentos trípticos (peptídeos clivados por tripsina), que são extraídos com solvente orgânico (diferentes proporções de acetonitrila e ácido trifluoroacético) do gel e cuja massa é determinada na análise. Neste tipo de análise, os fragmentos trípticos são misturados com uma matriz orgânica (ácido alfa-ciano-4-hidróxi-cinâmico) e cristalizados sobre uma placa de aço. Esta placa é introduzida no equipamento e irradiada por um feixe de raio *laser*, que faz com que a matriz se aqueça, sofra expansão e de início ao processo de desorção. Nestas condições, os fragmentos trípticos adquirem carga, em fase gasosa e por intensa diferença de potencial, sofrem desorção a partir de uma origem física comum (MALDI- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), sendo lançados através de um tubo de distância conhecida, por onde “voam” até um detector. O tempo que levam para atravessar este percurso (TOF – Time Of Flight) é utilizado para o cálculo de suas massas. O resultado é um espectro exibindo no eixo X a relação massa/carga (M/z) dos fragmentos trípticos encontrados e no eixo Y, sua intensidade relativa. Este tipo de espectro é chamado de *mass fingerprinting* por ser específico para cada proteína analisada. As informações obtidas no espectro podem ser consultadas em bancos de dados para a identificação da proteína de interesse [111, 112].

Diversos trabalhos têm sido publicados mostrando a aplicação desta metodologia. Recentemente, foi realizado um estudo comparando astrócitos humanos fetais normais com linhagens de glioblastoma multiforme humano (U87MG), utilizando 2D-PAGE e MALDI-TOF [113], tendo sido possível identificar 52 proteínas com expressão diferencial entre as amostras. Dentre estas, apenas quatro proteínas foram submetidas à outras técnicas para

confirmação, o que ainda é a etapa limitante, devido à dificuldade de obtenção de anticorpos para todas as proteínas de interesse.

Outro trabalho mostra a possibilidade de fazer estudo comparativo do líquido cefalorraquidiano de indivíduos saudáveis, e pacientes acometidos por gliomas, tendo sido possível encontrar potenciais marcadores tumorais, utilizando amostras de obtenção relativamente fácil em procedimento pouco invasivo [114].

Um estudo proteômico comparando tecido tumoral (glioma) com tecido de cérebro normal, encontrou cerca de 15 proteínas diferencialmente expressas, sendo algumas relacionadas com modulação de citoesqueleto [115].

A metodologia proteômica foi escolhida para ser utilizada neste trabalho de tese, devido às vantagens descritas e à descrição na literatura da aplicação desta técnica para a busca de respostas semelhantes às de nosso interesse.

Em paralelo a esta metodologia foram utilizadas técnicas de Genoma Funcional, para caracterização da função de um gene de interesse na reversão fenotípica do modelo celular estudado. Trata-se de um novo membro da família das serpinas, identificado como induzido por ATRA em ST1 após 10h de tratamento. O enfoque de Proteoma e Genoma Funcional vem sendo aplicado de forma expressiva para a compreensão do funcionamento celular nesta era pós-genômica, resultando em avanços de conhecimento importantes.

1.5. Inibidores de Serina Protease (Serpinas)

No presente trabalho é descrita a análise funcional de um dos genes isolados previamente em nosso laboratório como sendo regulados por ATRA em células ST1 [116]. Trata-se do gene *serpinb6* de rato (gi:40018547), conhecido como *spi3* em camundongo (gi:818902) e *PI(6)* em humanos (gi:41152085). Este gene foi isolado, através da técnica de hibridização subtrativa

acoplada a PCR supressivo (SSH) verificando-se que sua expressão era induzida pelo tratamento com 10^{-5} M ATRA por 10h.

Serpinb6 pertence à família das serpinas, inibidores de serina protease, uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, que regulam a atividade de proteínas serina protease, envolvidas em processos como coagulação, fibrinólise, fixação de complemento, implantação de embrião, apoptose, regeneração e degeneração neuronal, entre outros processos ainda pouco conhecidos [117, 118]. Os membros desta família incluem o gene supressor de tumor maspina, o antígeno de carcinoma de célula escamosa SCCA-1, entre outros [118, 119].

São poucos os trabalhos realizados com serpinb6, e um dos poucos dados da literatura indicam que IL-1 induz sua expressão em células beta de ilhota de rato. Através do tratamento com actinomicina D e cicloheximida foi verificado que não se trata de um processo de indução primária. O uso de um inibidor específico de NF- κ B, mostrou que a resposta de serpinb6 à IL-1 é dependente deste fator de transcrição nuclear. Elementos responsivos à NF- κ B foram encontrados no promotor de serpinb6 [120]. Um aumento de serpinb6 foi observado em processos inflamatórios de fígado de rato. IL-6 se mostrou um importante ativador da expressão de serpinb6 em hepatócitos primários e hepatomas de rato, sendo que seu nível de expressão é aumentado pelo uso de dexametasona. Elementos responsivos a glicocorticóides parecem estar presentes no promotor de serpinb6 [121], indicando que este gene pode ser importante em processos inflamatórios e de transformação maligna.

Como ainda há poucos trabalhos sobre serpinb6 na literatura, muito de sua função é inferida a partir de trabalhos realizados com seus homólogos PI-6 humano e spi3 de camundongo. A identidade entre as proteínas serpinb6 e hPI(6) é de 67% e a similaridade chega a 77%. Entre serpinb6 e spi3, a identidade é de 76% e a similaridade é de 82%.

Processos de lesão cerebral, como isquemia, promovem o aumento do nível de transcrição de spi3 [122]. Foi verificado, em extratos de tecido nervoso central, que spi3 é co-precipitado com neuropsina, uma serina protease extracelular com estrutura quimérica semelhante à tripsina e NGF- γ , envolvida com alterações de plasticidade dependente de atividade em neurônios. Uma das hipóteses propostas é que spi3 inibiria neuropsina antes da sua secreção, uma vez que a localização celular destes é diferente [123].

Atualmente, a ação de spi3 como inibidor de neuropsina em tecido nervoso e inibidor de catepsina G em granulócitos já foi comprovada. Os dados obtidos até o momento na literatura, permitem inferir que esta proteína abundantemente expressa em diversos tecidos e de localização nucleocitoplasmática, esteja envolvida com mecanismos de proteção celular durante a liberação ectópica de proteases, como ocorre em processos de estresse celular, como infecções e isquemias [124-126].

A construção de um camundongo *knock-out* para spi3 não mostrou alteração fenotípica alguma no animal, além de uma discreta sensibilidade à infecção por *Candida albicans*. Entretanto, posteriormente observou-se que estes animais *knock-out* para spi3 eram super-produtores de outras serpinas e poderia estar havendo efeito compensatório [124].

As serpinas, em geral, não possuem seqüência convencional sinalizadora para glicosilação e secreção, porém são glicosiladas e secretadas mediante estímulos específicos. O mesmo não ocorre com PI-6. Assim como todos os membros da família, este não possui sinal para secreção, porém, ao contrário dos outros membros, permanece retido no citoplasma, o que sugere a descoberta de uma nova classe de serpinas [117].

O tratamento com agentes como éster de forbol, TNF- α e análogos de AMPc, que estimulam a secreção de serpinas, não é

capaz de promover a secreção de PI-6. Uma construção que adiciona um peptídeo sinal convencional para secreção em PI-6 resultou em uma proteína glicosilada que permanece retida no retículo endoplasmático, sendo incapaz de prosseguir pela via retículo endoplasmático – complexo de Golgi, gerando uma proteína sem função biológica *in vitro* [117]

Recentemente, PI-6 foi encontrado em um complexo com calicreína humana 2 (hK2) que tem sua expressão aumentada em tecido prostático tumoral, sendo este complexo um importante marcador tumoral específico para este tecido. Acredita-se que este complexo se forme quando PI-6 é liberado para o meio extracelular por células degeneradas [127, 128]

PI-6 humano também é bastante expresso em células epiteliais, estando envolvido com o processo de diferenciação de queratinócitos e sendo modulado, também, em processos patológicos da pele [129].

O interesse pela análise funcional deste gene, em meio a outras possibilidades de genes igualmente isolados no laboratório como sendo induzidos por ATRA, foi o fato de outros membros da família das serpinas, como a maspina, estarem intimamente relacionados com o desenvolvimento de tumores [130].

Maspina apresenta expressão desregulada em muitos casos de câncer, principalmente de mama, estando associada à motilidade celular e conseqüentemente à invasividade tumoral, interagindo primariamente com p53, o que sugere que deva ser importante no processo de tumorigênese de outros tecidos também [131, 132]

Anti-trombina, um outro membro da família das serpinas, foi recentemente evidenciado como inibidor de angiogênese e crescimento tumoral, sendo sua expressão gradualmente perdida ao longo da evolução de tumores de próstata, chegando a desaparecer em tumores de alto grau, classificados pela escala de Gleason [133].

Outras serpinas recentemente descobertas, como a calistatina, também têm se mostrado potentes inibidores de angiogênese e crescimento tumoral, tanto *in vitro* quanto *in vivo* [134].

No presente trabalho, a porção codificante completa de *serpinb6*, e um fragmento *antisense* da porção 5' deste gene foram clonadas em vetor plasmideal e/ou retroviral para análise de sua função em células ST1 e T98G. O homólogo humano também foi clonado com sucesso.

2. RACIONAL

A forma *all-trans* do ácido retinóico (ATRA) é utilizada como adjuvante no tratamento de alguns tipos de glioma por apresentar propriedades anti-tumorais. No entanto, o mecanismo de ação deste fármaco ainda não foi totalmente esclarecido. A identificação de proteínas reguladas por ATRA durante o tratamento de linhagens celulares utilizadas como modelo de glioma, deve contribuir para a compreensão do papel anti-tumoral deste fármaco. Estudos prévios do nosso grupo mostraram a regulação específica de alguns genes em células ST1 por ATRA, através das metodologias de SSH e RDA. Entre estes genes, foi identificado um novo membro da família das serpinas, chamado serpinb6, cuja expressão é induzida em células ST1 após 10h de tratamento com 10^{-5} M ATRA. Com base nestas informações, foram delimitados os objetivos deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Revelar as bases moleculares da ação anti-tumoral de ATRA, através da utilização de técnicas de Proteoma e de Genoma Funcional, bem como encontrar marcadores moleculares para diagnóstico, prognóstico e potenciais alvos para terapia de gliomas.

3.2. Objetivos Específicos

a) Identificar as alterações induzidas por ATRA sobre o perfil proteômico das células ST1 de glioma de rato e T98G de glioma humano, através de 2D-PAGE e MALDI-TOF.

b) Verificar o nível de expressão do gene *serpinb6* ou do seu homólogo humano *hPI(6)*, induzido por ATRA, no modelos celulares de glioma de rato C6 e ST1, e nos modelos de glioma humano T98G e A172, através de *Northern blot* e *Real Time PCR*.

c) Gerar construções plasmídeais e retrovirais para modular o nível de expressão do gene *serpinb6* através de transferência gênica para ST1 e T98G, e investigar o papel da proteína correspondente, utilizando diferentes ensaios celulares, com enfoque de genômica funcional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Plasmídeos

pENTER 2B (Invitrogen)

Vetor de entrada do Sistema Gateway (Invitrogen), onde os insertos são inicialmente clonados, para em seguida serem transpostos para os vetores de expressão

pDest12.2 (Invitrogen)

Vetor de expressão em células de mamífero do Sistema Gateway (Invitrogen)

pLPCX (Clontech)

Vetor retroviral de expressão em células de mamífero

4.1.2. Construções geradas no presente trabalho

pENTR 2B-serpinb6

Porção codificante completa de serpinb6 de rato clonado em pENTR 2B

pENTR 2B-serpinb6-mut

Porção codificante completa de serpinb6 de rato, contendo 5 mutações, clonado em pENTER 2B

pDEST12.2-serpinb6-mut

Porção codificante completa de serpinb6 de rato, contendo 5 mutações, clonado em pDest12.2

pDEST12.2-neg

Vetor pDEST12.2 sem inserto e com o gene tóxico para bactérias deletado, utilizado como controle negativo

pLPCX–neg

Vetor pLPCX vazio, utilizado como controle negativo

pLPCX–serpinb6

Porção codificante completa de serpinb6 de rato clonado em pLPCX

PLPCX-serpinb6-mut

Porção codificante completa de serpinb6 de rato, contendo 5 mutações, clonado em pLPCX.

pLPCX–serpinb6–AS

Fragmento *antisense* da região 5' de serpinb6 de rato, clonado em pLPCX

pLPCX–hPI (6)

Porção codificante completa de hPI(6) clonado em pLPCX

pLPCX–hPI (6)-AS

Fragmento *antisense* da região 5' de hPI(6), clonado em pLPCX

pLPCX–EGFP

Porção codificante completa da proteína EGFP clonada em pLPCX

4.1.3. Linhagens celulares

C6: linhagem celular de glioma de rato induzido quimicamente por metilnitrosouréia, responsiva ao tratamento com glicocorticóide e ácido retinóico, sofrendo inibição de crescimento (ATCC number: CCL 107) [53].

ST1: linhagem celular derivada de C6, a qual é hiper-responsiva ao tratamento com glicocorticóides e responsiva ao tratamento com ácido retinóico, sofrendo reversão fenotípica tumoral-normal por ação destes fármacos. Obtida em nosso laboratório [56].

T98G: linhagem celular derivada de glioblastoma multiforme humano, independente de ancoragem para crescimento e incapaz de gerar tumor *in vivo* (ATCC number: CRL 1690) [135].

A172: linhagem celular derivada de glioblastoma multiforme humano independente de ancoragem para crescimento e incapaz de gerar tumor *in vivo* (ATCC number: CRL 1620) [136].

φnx-AMPHO: linhagem celular empacotadora anfotrópica, derivada da linhagem de rim embrionário humano transformada 293-T, fornecida pelo Dr. Gary Nolan – Universidade de Stanford, CA, USA.

NIH-3T3: linhagem celular derivada de fibroblasto de embrião de camundongo Swiss do NIH – National Institutes of Health (ATCC number: CRL 1658) [137]

4.1.4. Soluções e meios de cultura para células de mamífero

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco BRL – Life Technologies)

SFB: soro fetal bovino (Cultilab)

PBSA: solução salina (phosphate buffered saline), sem cálcio ou magnésio, tamponada em pH 7,2 composta por NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8mM e KH₂PO₄ 1,5mM.

tripsina: (ICN Pharmaceuticals Inc.; Gibco Limited)

4.1.5. Meio de cultura e suplementos para bactérias

LB: meio de Luria-Bertani, contendo 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl, pH 7,5.

LB-ágar: meio LB contendo 1,5% de ágar, para cultivo em placas.

Ampicilina: solução estoque 100mg/mL, em água.

Cloranfenicol: solução estoque 34mg/mL em etanol.

Kanamicina: solução estoque 50mg/mL em água.

4.1.6. Isótopos radioativos

[$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (3.000Ci/mmol) (Amersham International plc, Buckinghamshire, Inglaterra)

solução de timidina tritiada (20X concentrada) – (5 $\mu\text{Ci/mL}$ de timidina radioativa; $2 \times 10^{-6}\text{M}$ de timidina fria) (Amersham International plc, Buckinghamshire, Inglaterra)

metionina ^{35}S (1.000Ci/mmol) (Amersham Biosciences)

4.1.7. Reagentes

Ácido retinóico, Iodoacetamida, Puromicina, Geneticina, Higromicina (Sigma)

Uréia, CHAPS, DTT, Pharmalytes pH 3-10 (Amersham Biosciences)

4.1.8. Material para eletroforese bidimensional

Unidade horizontal de eletroforese Multiphor II, Unidade vertical de eletroforese Ettan Dalt Six, Fonte de energia EPS 3500XL, Circulador termostático Multitemp II, Reswelling tray, Immobiline DryStrips pH 3-10 NL 18cm e pH 3-10 L 11cm, ExcelGel SDS gradiente 8-18% e homogêneo 12.5%, ExcelGel SDS buffer strips (Amersham Biosciences).

4.1.9. Soluções

As soluções utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram preparadas a partir de reagentes de grau de pureza adequados, segundo especificações de manuais de laboratório [138, 139].

Tampão de amostra para DNA: formamida deionizada 98%; EDTA 10mM; xileno cianol 0,025%; azul de bromofenol 0,025%.

TBE (5X): Tris 446mM; ácido bórico 445mM; EDTA 10mM; pH 8,0. Utilizado na concentração 1X para corrida de gel de agarose.

TE: Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 8,0.

Tampão de lise celular para eletroforese bidimensional: uréia 9M; CHAPS 2%; DTT 50mM; Pharmalytes pH 3-10 1,5%.

Tampão de reidratação das fitas de gel da primeira dimensão: uréia 8M; CHAPS 2%; Pharmalytes pH 3-10 0,5%; DTT 13mM; traços de azul de bromofenol.

Tampão I de equilíbrio das fitas em SDS: Tris-HCl pH 6,8 50mM; uréia 6M; glicerol 30%; SDS 1%; DTT 2,5mg/mL.

Tampão II de equilíbrio das fitas em SDS: Tris-HCl pH 6,8 50mM; uréia 6M; glicerol 30%; SDS 1%; iodoacetamida 45mg/mL; traços de azul de bromofenol.

Solução de fixação de géis 2D: etanol 50%; ácido acético glacial 10%; Fixative Enhancer Concentrate (Bio-Rad) 10%.

Solução de preservação de géis 2D: etanol 30%; glicerol 4% no caso de coloração por prata, e sulfato de amônio 20% no caso de coloração com coomassie coloidal.

Coomassie Blue coloidal: 170g de sulfato de amônio, 1g de Coomassie Brilliant Blue 250 G, 30mL de ácido fosfórico, 340mL de metanol e 660mL de água.

Tampão hipotônico para extração de proteínas nucleares:

HEPES 10mM; MgCl₂ 1,5mM; KCl 10mM; PMSF 0,2mM; DTT 0,5mM.

Tampão de baixa concentração salina para extração de proteínas nucleares:

HEPES 20mM; glicerol 25%; MgCl₂ 1,5mM; KCl 0,02M; EDTA 0,2mM; PMSF 0,2mM; DTT 0,5mM.

Tampão de alta concentração salina para extração de proteínas nucleares:

HEPES 20mM; glicerol 25%; MgCl₂ 1,5mM; KCl 10,2M; EDTA 0,2mM; PMSF 0,2mM; DTT 0,5mM.

RIPA⁺: Tris-HCl pH 7,5 10mM; desoxicolato de sódio 1%; Nonidet P40 1%; NaCl 150mM; SDS 0,1%; PMSF 1mM; DTT 1mM.

Tampão MOPS: acetato de sódio 10mM; EDTA 1mM; MOPS 40mM.

SSC (20X): NaCl 3M; citrato trissódico dihidratado 300mM; pH 7,0.

Tampão de lise para extração de RNA: isotiocianato de guanidina 4M; citrato de sódio 25mM pH 7,0; β-mercaptoetanol 0,1M.

Solução de cloreto de cézio: cloreto de cézio 5,7M; acetato de sódio 25mM; pH 5,0.

Tampão I para lavagem da membrana de *Northern blot*: SSC 2X; SDS 0,1%.

Tampão II para lavagem da membrana de *Northern blot*: SSC 0,1X; SDS 0,1%.

4.2. Métodos

4.2.1. Cultivo celular

4.2.1.1. Manutenção das linhagens celulares

As células de mamífero foram cultivadas a 37°C em frascos plásticos contendo DMEM suplementado com 2%, 5% ou 10% SFB, 1,2g/L de bicarbonato de sódio, 25mg/L de ampicilina e 100mg/L de estreptomicina, em atmosfera de 2% de CO₂/98% de ar para manutenção do pH próximo ao fisiológico. As células foram subcultivadas sempre que atingiram 80% da densidade de saturação. Para tal, o meio de cultura foi removido, a cultura lavada uma vez com PBSA e, então, tripsinizada. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo 10% de DMSO a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

4.2.1.2. Congelamento das linhagens celulares

A cultura foi tripsinizada e as células foram ressuspensas em 2mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, para inativação da tripsina. A suspensão foi centrifugada a 1.000 rpm (centrífuga Fanem Excelsa II 206MP, rotor 8x15mL) por 3 minutos, o sobrenadante removido e o sedimento celular ressuspendido em meio de congelamento (DMEM, 10% SFB, 10% DMSO), de modo a haver ao menos 1x10⁶ células/mL. Esta suspensão de células foi transferida para ampola de congelamento (NUNC) e incubada por 30 minutos a 4°C. Após este período, a ampola foi transferida para -80°C, onde permaneceu por 24h, antes de ser transferida para o reservatório de nitrogênio líquido.

4.2.1.3. Descongelamento das linhagens celulares

A ampola contendo a linhagem celular de interesse foi retirada do nitrogênio líquido e descongelada em banho-maria a 37°C. Após

descongelamento, a suspensão foi transferida para frasco de cultura contendo meio de cultura adequado. Após adesão das células ao frasco, o meio de cultura foi trocado para eliminação de restos de DMSO do congelamento.

4.2.2. Eletroforese bidimensional

4.2.2.1. Tratamento das células com ácido retinóico

O ácido retinóico *all-trans* (ATRA) foi dissolvido em etanol, gerando uma solução estoque 10^{-2} M. Para tratamento, este estoque foi diluído 1.000 vezes em DMEM contendo 2% SFB, de modo que a concentração final de ATRA no meio de tratamento fosse 10^{-5} M. Às células controle foi adicionado o mesmo volume de etanol, o veículo do ácido retinóico, e as culturas foram incubadas a 37°C e 2% CO₂ pelo tempo de tratamento.

4.2.2.2. Marcação metabólica de células ST1 com metionina radioativa

O número de células plaqueadas para o tratamento foi sempre calculado levando-se em consideração o tempo de tratamento para que a confluência fosse a desejada no final do experimento. Tanto na placa controle quanto na tratada colocou-se sempre o mesmo número de células. Para tratamentos por 10h, o número de células plaqueadas foi de 4×10^4 células/cm².

Antes da marcação metabólica, foi realizada a fase de pré-marcação, para retirar metionina fria do meio de cultura.

Na pré-marcação metabólica, o meio de cultura foi totalmente aspirado e a monocamada lavada 2 vezes com PBSA. Foram adicionados 5mL (em uma placa P100) de meio de pré-marcação, e a placa foi incubada em estufa por 30 minutos. Após 30 minutos, o meio foi trocado por 2,5mL de meio de marcação. O meio de pré-marcação é composto por 4,7mL de DMEM sem metionina, 250μL

de DMEM normal, 100 μ L de SFB dialisado, 500 μ L de glutamina 10X e 5 μ L de ácido retinóico 10⁻²M (tratamento) ou etanol (controle). O meio de marcação é composto por 2,5mL de DMEM sem metionina, 125 μ L de DMEM normal, 50 μ L de SFB dialisado, 250 μ L de glutamina 10X, 2,5 μ L de ácido retinóico ou etanol e 250 μ Ci de metionina marcada em ³⁵S. O meio de marcação foi adicionado 1,5h antes do momento da lise das células e as células foram tratadas com ácido retinóico por 10h.

4.2.2.3. Quantificação de proteínas por incorporação de metionina radioativa

Foram aplicados 3 μ L de cada extrato protéico em pedaços de papel 3MM e estes foram secos ao ar. A análise foi feita em duplicata. Os papéis foram lavados com TCA 10% e após lavagem, os papéis foram colocados em tubos de cintilação com 3mL de líquido de cintilação. As amostras foram lidas no cintilador (liquid scintillation analyzer – Packard). O valor obtido do cintilador foi utilizado para a normalização da quantidade de proteínas aplicada no gel de focalização isoeletrica.

4.2.2.4. Preparação de extrato protéico total de ST1 e T98G

As células foram cultivadas em placas P150. Após o tempo desejado de tratamento, o meio de cultura foi descartado, a monocamada de células foi lavada uma vez com PBSA gelado e foram adicionados 100 μ L de tampão de lise (RIPA⁺). A placa foi raspada com um rodinho e o material coletado em tubo de microcentrífuga para ser centrifugado a 16.000g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C. Para eletroforese bidimensional, antes do fracionamento das amostras em gel, estas foram precipitadas para dessalinização, utilizando-se o kit 2D Clean

Up (Amersham Biosciences) e ressuspensas em tampão de reidratação para primeira dimensão.

4.2.2.5. Preparação de extratos protéicos das frações subcelulares de ST1

Após o tratamento com ATRA pelo tempo desejado, as culturas em placas P150 foram lavadas com PBSA gelado. A seguir, foi adicionado 1mL de PBSA gelado na placa, as células foram raspadas com um rodinho e transferidas para tubo de microcentrífuga. O tubo foi centrifugado a 1.850xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o volume celular empacotado (PCV) foi estimado. O sedimento foi ressuspendido em 5 PCV de tampão hipotônico (Hepes 10mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5mM, KCl 10mM, PMSF 0,2mM, DTT 0,5mM) e o tubo foi centrifugado a 1.850xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido em 3 PCV de tampão hipotônico e incubado no gelo por 10 minutos para que ocorresse o aumento do volume celular. Os núcleos foram coletados por centrifugação a 3.300xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante desta centrifugação foi utilizado como fração citoplasmática. O sedimento contém os núcleos, cujo volume foi estimado (PNV). Este foi ressuspendido em ½ PNV de tampão de baixa concentração salina (Hepes 20mM pH 7,9, glicerol 25%, MgCl₂ 1,5mM, KCl 0,02M, EDTA 0,2mM, PMSF 0,2mM e DTT 0,5mM) e lentamente ½ PNV de tampão de alta concentração salina (Hepes 20mM pH 7,9, glicerol 25%, MgCl₂ 1,5mM, KCl 1,2M, EDTA 0,2mM, PMSF 0,2mM e DTT 0,5mM) foram adicionados. Após a adição do tampão de alta concentração salina, o tubo foi incubado no gelo por 30 minutos com agitação periódica e ao final, foi centrifugado por 30 minutos a 25.000xg a 4°C. O sobrenadante desta centrifugação é o extrato nuclear. Estes extratos foram dessalinizados com o kit 2D Clean Up (Amersham-Biosciences), ressuspensos em tampão de reidratação para eletroforese

bidimensional e quantificados em espectrofotômetro pelo método de Bradford para normalização da quantidade de proteínas aplicadas na isoeletrofocalização.

4.2.2.6. Dessalinização dos extratos nucleares para focalização isoelétrica

A dessalinização foi feita utilizando-se o kit de precipitação 2-D Clean-up (Amersham Biosciences), de acordo com o protocolo do fabricante. Este kit se baseia na utilização de um precipitante e um co-precipitante. Após precipitação, a solução foi centrifugada, o sobrenadante removido e o precipitado ressuspensionado em água deionizada. A esta suspensão foi adicionado tampão de lavagem e o tubo foi mantido a -20°C por 30 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi removido e o precipitado protéico redissolvido em tampão de solubilização protéica compatível com isoeletrofocalização. A amostra foi clarificada a 16.000xg por 30 minutos a 4°C e então armazenada a -70°C.

4.2.2.7. Reidratação do gel da primeira dimensão (IPG strips)

Foram utilizadas fitas com gradiente de pH imobilizado de 18cm ou 11cm (IPG strips) com variação de pH de 3 a 10 linear ou não linear, que têm capacidade de absorver até 350µL (18cm) ou 280µL (11cm) de volume total (amostra em tampão de reidratação, tomando-se o cuidado de o volume de amostra não ultrapassar ¼ do volume total). As fitas de gel foram reidratadas na mistura amostra/tampão por 16h, cobertas com óleo mineral para não secar.

Tampão de reidratação: uréia 8M; CHAPS 2%; Pharmalytes 3-10 NL 0,5%; DTT 13mM e traços de azul de bromofenol.

4.2.2.8. Focalização isoeétrica

Para a realização da primeira dimensão foi utilizado o sistema Multiphor II (Amersham Biosciences), preparado de acordo com o manual de instruções do fabricante.

Os programas utilizados estão descritos nas tabelas abaixo.

Tabela A: Programa de isoeletrofocalização para fitas de 18cm

VOLTAGEM	CORRENTE	POTÊNCIA	TEMPO
0-150V	1mA	5W	1 minuto
150V	1mA	5W	30 minutos
150-300V	1mA	5W	5 minutos
300V	1mA	5W	1 hora
300-3500V	1mA	5W	3 horas
3500V	1mA	5W	11h 15min

Tabela B: Programa de isoeletrofocalização para fitas de 11cm

VOLTAGEM	CORRENTE	POTÊNCIA	TEMPO
0-150V	1mA	1W	1 minuto
150V	1mA	1W	30 minutos
150-300V	1mA	1W	5 minutos
300V	1mA	1W	1 hora
300-3500V	1mA	1W	3 horas
3500V	1mA	1W	6h 30min

Após a focalização isoeétrica as fitas foram acondicionadas em placas de Petri e armazenadas a -70°C.

4.2.2.9. Segunda dimensão da eletroforese bidimensional

Para a realização da segunda dimensão, foi utilizado o sistema Multiphor II, ou Ettan DALT Six (Amersham Biosciences), preparados de acordo com o manual de instruções do fabricante.

Antes de prosseguir à segunda dimensão as fitas da primeira dimensão foram equilibradas em tampão contendo SDS, por 10 minutos na solução de equilíbrio I e 10 minutos na solução de equilíbrio II.

Foram utilizados géis de poliacrilamida em gradiente de 8 a 18% para o extrato total marcado metabolicamente com metionina radioativa e géis homogêneos de 12,5% para os demais extratos.

A solução I contém 0,5mL de Tris pH 6,8 1M; 3,63g de uréia; 3,0mL de glicerol 87%, 100mg de SDS; 25mg de DTT e água *Milli-Q* em quantidade suficiente para 10mL.

A solução II contém 0,5mL de Tris pH 6,8 1M; 3,63g de uréia; 3,0mL de glicerol 87%; 100mg de SDS; 450mg de iodoacetamida; traços de azul de bromofenol e água *Milli-Q* em quantidade suficiente para 10mL.

4.2.2.10. Coloração do gel com prata ou Coomassie Blue coloidal

Os géis bidimensionais foram corados com prata utilizando-se o kit Silver Stain Plus (Bio-Rad), conforme manual de instruções do fabricante. Utilizando-se este kit, o gel a ser corado foi embebido sob agitação na solução de revelação contendo nitrato de amônio, nitrato de prata, ácido tungstosilícico, formaldeído e carbonato de sódio. Após visualização dos spots, a reação foi interrompida utilizando-se solução de ácido acético a 5% por 15 minutos. O gel foi então lavado com água *Milli-Q* e preservado em solução contendo glicerol 4%. Para a coloração com Coomassie coloidal, o gel foi incubado por 16h em solução de Coomassie Blue coloidal, lavado por 5 minutos em etanol 25% e preservado em solução de sulfato de amônio 20% a 4°C.

4.2.2.11. Preservação e secagem dos géis bidimensionais para exposição à tela de európio do *Storm PhosphorImager* ou escaneamento

Após coloração com prata, o gel foi lavado por 5 minutos com água deionizada, 2 vezes com etanol 30% por 30 minutos e 1 hora com solução de preservação (etanol 30%, glicerol 4%). Após as lavagens o gel foi envolvido em celofane e posto para secar por 24h. No caso de exposição à tela do *Storm PhosphorImager*, antes da coloração com prata, o gel foi incubado por 30 minutos com Amplify™ (Amersham Biosciences) para aumentar o sinal da emissão radioativa da metionina marcada e então seco em solução de preservação, conforme descrito acima. Este gel seco foi exposto ao cassete de európio por 1 semana e após revelação, foi reidratado (etanol 30% e glicerol 4%) e corado com prata.

4.2.2.12. Análise de imagem dos géis 2D

A análise de imagem foi realizada com o auxílio do programa Image Master 2D Elite (Amersham Biosciences)

4.2.2.13. Excisão de *spots* dos géis bidimensionais, descoloração e digestão protéica *in gel*.

A excisão dos *spots* de interesse foi feita manualmente com o auxílio de uma agulha nova. Todos os procedimentos foram feitos em câmara de fluxo laminar, sobre placas de vidro limpas e a agulha permaneceu embebida em etanol 90% entre cada excisão, para evitar qualquer tipo de contaminação entre *spots*. Cada *spot* de interesse foi transferido para um tubo de microcentrífuga novo (tubo Axygen).

Para a descoloração, cada *spot* foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente com 100µL de uma solução contendo ferricianeto de potássio 15mM e tiosulfato de sódio 50mM. Em seguida, a solução de descoloração foi removida e o material foi

lavado 3 vezes com 400 μ L de água *Milli-Q* por 15 minutos. O gel foi, então, picado em pedaços menores para aumentar a superfície de contato com os reagentes e transferido para um novo tubo.

Este material foi incubado 2 vezes por 15 minutos com 400 μ L de acetonitrila (ACN) 50%, contendo 25mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 e 1 vez com ACN 100% por 5 minutos para desidratação. A ACN foi removida e o material foi submetido à centrifugação à vácuo (*speed-vac*) para secar.

Após retirar o material totalmente seco do *speed-vac*, este foi incubado por 1h a 56°C com volume suficiente para cobrir o gel, de uma solução 10mM de DTT em bicarbonato de amônio 100mM. Após resfriamento do gel a temperatura ambiente, a solução foi substituída pelo mesmo volume de iodoacetamida 55mM em bicarbonato de amônio 100mM. O tubo foi incubado a temperatura ambiente, por 45 minutos no escuro, sendo vortexado ocasionalmente.

O material foi lavado novamente 2 vezes com bicarbonato de amônio 100mM, 1 vez com ACN 100% e desidratado por centrifugação à vácuo.

O material foi reidratado por 45 minutos no gelo com 20 μ L de tampão de digestão, contendo 25mM de bicarbonato de amônio e 10 μ g/mL de tripsina especial para espectrometria de massa (Promega). Após 45 minutos, adicionou-se mais tripsina, para compensar pela absorvida pelo gel e o tubo foi incubado a 37°C por 16-24h.

4.2.2.14. Extração dos peptídeos trípticos do gel

Após a digestão com tripsina por 16-24h, o sobrenadante da solução de digestão foi transferido para um tubo de microcentrífuga limpo (tubo A). Ao tubo contendo o gel, foram adicionados 25-50 μ L de ACN 50%/TFA 5% e os peptídeos foram extraídos por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação (vortex) ocasional.

Este sobrenadante foi então transferido para o tubo A e este procedimento de extração foi repetido mais uma vez.

O conteúdo do tubo A foi completamente seco sob centrifugação a vácuo e o resíduo foi redissolvido em 10 μ L de TFA 0,1%.

4.2.2.15. Preparação da amostra para espectrometria de massa através de dessalinização e concentração com micro colunas de fase reversa (*zip tips*)

Antes de pipetar a amostra, cada *zip tip* (tips contendo fase reversa C18 empacotados - Millipore) foi equilibrado com 10 μ L de ACN 100%, 10 μ L ACN 50% /TFA 0,1% e então, 2 vezes com 10 μ L de TFA 0,1%. Após o equilíbrio a solução contendo a amostra (os peptídeos tripticos extraídos) foi pipetada de 5 a 10 vezes e o líquido foi descartado. O *zip tip* foi lavado 3 vezes com 10 μ L de TFA 0,1% e, logo após, a amostra foi eluída com 5 μ L de ACN 50%/TFA 0,1%.

4.2.2.16. Análise dos peptídeos por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Para a análise por MALDI-TOF, foram misturados 1 μ L da amostra com 1 μ L da matriz orgânica alfa-ciano (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico). Esta solução foi aplicada na placa de aço inoxidável do aparelho onde ocorreu a cristalização. O equipamento utilizado foi o Ettan (Amersham Biosciences), instalado no laboratório do Professor Antonio Carlos Martins Camargo no Instituto Butantan. Uma vez obtidos os valores de massa correspondentes a cada peptídeo presente nas amostras, estes foram submetidos à comparações com bancos de dados disponíveis na Internet, através de programas como o MASCOT (www.matrixscience.com), o Peptident e o ALDENTE (www.expasy.ch)

4.2.3. Clonagem dos genes de interesse

4.2.3.1. Preparação de DNA plasmideal em pequena escala

As preparações de DNA plasmideal em pequena escala foram feitas utilizando-se kits comerciais, para procedimentos que exigiam maior grau de pureza, ou pelo método clássico de lise alcalina descrito nos manuais de laboratório. Neste caso, o inóculo foi centrifugado a 16.000 x g por 30s, ressuspendido em tampão GET, lisado em presença de NaOH e SDS, neutralizado com solução de acetato de potássio e centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o DNA plasmideal precipitado com etanol ou isopropanol. O precipitado de DNA plasmideal foi lavado com etanol 70%, brevemente seco e ressuspendido em 50µL de TE ou água.

4.2.3.2. Preparação de DNA plasmideal em média escala

As preparações de DNA plasmideal foram feitas utilizando-se o kit Qiagen Plasmid Midi Kit, de acordo com instruções do fabricante.

4.2.3.3. Transformação de bactérias com DNA plasmideal por eletroporação

O DNA plasmideal de interesse (1-50ng) foi adicionado a uma alíquota de 40µL de bactérias eletrocompetentes, e esta mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (gap 2mm). O eletroporador (EC 100) foi ajustado para 2.800V e o pulso foi aplicado. Imediatamente em seguida, foi adicionado 1mL de meio LB por cubeta e estas foram incubadas a 37°C por 1 hora, sob agitação de 200 rpm. As bactérias assim transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo o antibiótico adequado. As placas foram incubadas a 37°C por 16h.

4.2.3.4. Extração de RNA total [140]

O meio de cultura foi removido e a camada celular foi lavada duas vezes com PBSA a temperatura ambiente. As placas foram, então, invertidas sobre papel toalha úmido. Foi adicionado à placa 1,5mL de tampão de lise (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25mM pH 7 e β -mercaptoetanol 0,1M), e com o auxílio de um rodinho, a camada de células foi removida, sendo o lisado recolhido com uma pipeta Pasteur para um tubo cônico limpo. O tubo foi mantido no freezer a -70°C até a etapa da ultracentrifugação. Nesta etapa, todo o volume de lisado foi depositado sobre um volume de 2,0mL de um colchão de cloreto de cézio (cloreto de cézio 5,7M e acetato de sódio 25mM pH 5,0), contido em um tubo de nitrocelulose. A ultracentrifugação ocorreu a 37.000 rpm (Centrífuga Hitachi CP 85 β , rotor P55ST2 6x5mL) a 20°C por 20h. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de forma contínua até a camada contendo DNA, sendo o restante descartado. O tubo foi mantido emborcado e suas paredes foram limpas com papel absorvente livre de RNase. O RNA sedimentado foi redissolvido em 60 μL de água *Milli-Q*, quantificado espectrofotometricamente a 260nm (onde uma absorção de 1,0 equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ de RNA) e a 280nm (para avaliar o grau de pureza) e mantido a -70°C .

4.2.3.5. RT-PCR

Foi preparada uma solução "A", contendo tampão específico (first strand buffer) na concentração 1X, DTT, inibidor de RNase (RNase OUT) e Superscript II (GibcoBRL) e uma solução "B" contendo oligo(dT)₁₂₋₁₈, RNA molde e dNTP. A solução "B" foi incubada a 70°C por 2 minutos e transferida para o gelo. Em seguida, a solução "A" foi misturada à solução "B". Esta mistura foi incubada a 42°C por 40 minutos e 50°C por 30 minutos. Ao final, a reação foi interrompida pela incubação a 70°C por 15 minutos. O produto final foi tratado com RNase H.

4.2.3.6. Desenho de *primers*

Todos os *primers* utilizados no projeto foram desenhados com base em seqüências disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e com o auxílio do programa *Primer 3* (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Os *primers* foram sintetizados pela empresa Invitrogen ou IDT. Abaixo estão as seqüências dos *primers* utilizados nos experimentos descritos neste trabalho:

Primers utilizados para amplificação de *serpinb6* de rato, desenhados com base no homólogo *spi3* de camundongo.

mSPI3F: 5'TCT CTG CTT GCT ACC AGT CCG GAA ATC GAG A 3'

mSPI3R: 5' TGG GTT ACA GCA AAC CAT GGA GAG AGG GTC A 3'

Primers utilizados para amplificação de *serpinb6* de rato, desenhados com base em EST´s de rato.

rSPI3F: 5' GTC GAC CAC CAT GGA TCA TCT ACA 3'

rSPI3R: 5' GCG GCC GCT GAC AGA CAC ACA CTT TCC TCA 3'

Primers utilizados no seqüenciamento de *serpinb6* de rato.

5RACESPI3R: 5' TCCACCTCCATTGCCGCTGCATTTA 3'

3RACESPI3R: 5' GCACAACCACACGAACCGCACAAACA 3'

Primers utilizados para amplificação de um fragmento *antisense* na região 5' de *serpinb6* de rato, desenhados com base na seqüência completa de *serpinb6* de rato depositada no *GenBank*.

5ANTISPI3: 5' ACGCGTCGACTGTGTCACCCTTGAAGTCCA 3'

3ANTISPI3: 5'ATAAGAATGCGGCCGCGGTCCGGAAATCCAGAGTCTA3'

Primers utilizados para amplificação da porção codificante completa de *hPI(6)*, o homólogo humano de *serpinb6* de rato.

hPI(6)FullF: 5'ACGCGTCGACCACCATGGATGTTCTCGCAGAAGCAAATGGCACCTT 3'

hPI(6)FullR: 5'ATAAGAATGCGGCCGCTCACGGAGAGGAAAACCGGCCGAGAAGAGAATC 3'

Primers utilizados para amplificação de um fragmento *antisense* na região 5' de hPI(6), desenhados com base na sequência completa de hPI(6) depositada no *GenBank*.

hPI (6) ANTISENSE

1: 5'ATAAGAATGCGGCCGCGCTCGGACACGCTGGCTTG 3'

hPI (6) ANTISENSE 2: 5' ACGCGTCGACCTTCTCTACGGCGCTGATAAAGTC 3'

Primers utilizados para reação de *Real Time PCR* para *serpinb6* de rato, desenhado com base em sequência do *GenBank*

rSpiRealF: 5' GAGTGGACGAGGCTGGACAT 3'

rSpiRealR: 5' TTGCCGAGGACAACCTTCAT 3'

Primers utilizados para reação de *Real Time PCR* para hPI(6), desenhado com base em sequência do *GenBank*.

hPI (6) RealF: 5' CAAATCTTGGTGCTTCCATATGTT 3'

hPI (6) RealR: 5' GAGTTCTTTCTCCACCGTTCTCA 3'

4.2.3.7. PCR

A reação de PCR padrão que foi utilizada é composta por tampão de *Taq* na concentração final 1X; 0,2mM de dNTP; 0,4μM de *primers forward* e *reverse*; 10U de *Taq Platinum Hi Fi* (amplificações para clonagem) ou *Biolase* (amplificações para checagem de construções), 1,5mM de cloreto de magnésio ou 2mM de sulfato de magnésio e DNA molde (em alguns casos, diferentes concentrações de cloreto de magnésio foram utilizadas, variando de 1,0 a 2,5mM). O programa padrão utilizado foi 94°C 1 minuto, 94°C 30 segundos, 57°C 30 segundos e 72°C 1,5 minutos, sendo realizados 30 ciclos. Adaptações do programa foram feitas de acordo com o fragmento desejado. As reações de PCR de colônia descritos neste trabalho foram feitas utilizando-se 1μL de inóculo bacteriano líquido como molde.

4.2.3.8. Clonagem de *serpinb6* de rato em pENTR 2B

O fragmento a ser clonado foi amplificado por PCR, com os *primers* rSPI3F e rSPI3R, que adicionam adaptadores para clivagem com *Sall* e *NotI* ao fragmento amplificado. O produto de PCR (100µl de reação de 25 ciclos) e o vetor pENTR 2B (200ng) foram clivados com as enzimas de restrição *Sall* e *NotI* a 37°C por 2h. O vetor foi desfosforilado com a enzima CIAP e após purificação de vetor e inserto com kit específico (GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit), e concentração no *speed vac* (concentração para 10µL de ambos), estes foram ligados na proporção 1:3 (vetor:inserto) através de incubação a 16°C por 48h com DNA ligase (Fermentas) em tampão específico. O produto da ligação foi inativado a 65°C por 15 minutos e utilizado para transformar bactérias DH10B eletrocompetentes. A seleção foi feita através de plaqueamento em meio seletivo (kanamicina 50µg/mL).

4.2.3.9. Transposição de *serpinb6* de rato de pENTR 2B para pDEST12.2

Utilizou-se o protocolo padrão da Invitrogen, porém o volume final foi reduzido para ¼ do recomendado para aumentar o rendimento do kit. A reação foi preparada com 1µL de LR reaction buffer, 1µL de pENTR 2B-*serpinb6*, 1µL de pDEST12.2 linearizado no sítio de *MluI*, 1µL de LR clonase e 1µL de TE. O tubo de microcentrífuga foi incubado por 48h a temperatura ambiente, a enzima foi inativada por calor (65°C por 15min), e o produto de reação foi diluído em água na proporção ¼. Foram utilizados 2µL desta diluição para transformar bactérias DH10B por eletroporação e a seleção foi feita através de plaqueamento em meio seletivo (100µg/mL de ampicilina).

4.2.3.10. Obtenção do controle negativo pDEST 12.2-neg.

O vetor pENTR 2B foi clivado com a enzima *EcoR* I para a retirada do gene tóxico *ccdB* e re-ligado com ligase (New England). Este vetor, chamado pENTR 2B- Δ *ccdB* foi utilizado em uma reação de transposição para o vetor pDEST12.2, conforme descrito no item anterior, gerando a construção utilizada como controle negativo pDEST12.2-neg.

4.2.3.11. Clivagem de DNA com enzimas de restrição

Reações analíticas foram feitas em volume final de 10 μ L, contendo 0,3 μ L da enzima específica, 4 μ L de produto de mini-prep e tampão adequado. Reações preparativas para clonagem estão descritas nos protocolos de clonagem específicos.

4.2.3.12. Purificação de DNA a partir de gel de eletroforese ou solução

Todas as purificações de DNA foram feitas utilizando-se o kit GFXTM PCR DNA and gel band purification (Amersham Biosciences), de acordo com o protocolo do fabricante.

4.2.3.13. Preparação do vetor pLPCX para clonagem

O vetor pLPCX foi obtido a partir de midi-prep. Por ser um plasmídeo de baixo número de cópias, o cultivo das bactérias para midi-prep foi feito na presença de cloranfenicol. Inicialmente foi preparado um inóculo das bactérias contendo o plasmídeo pLPCX em 6mL de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), até OD_{600nm} de 0,6. Ao atingir a densidade óptica desejada, este inóculo foi transferido para um erlenmeyer contendo 100mL de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), até OD_{600nm} de 0,8. Ao atingir esta densidade óptica, foi adicionado cloranfenicol, na concentração final de 170 μ g/mL e o inóculo foi mantido no shaker sob agitação de 200 rpm a 37°C por 16h, até a densidade óptica subir para 1,1.

4.2.3.14. Clonagem de serpinb6 de rato e o homólogo hPI (6) humano, *sense* e *antisense* em pLPCX

O vetor pLPCX (200ng) foi clivado em *Bgl*II e *Not*I e desfosforilado com CIAP. Os insertos foram obtidos por amplificação por PCR (*antisense* de serpinb6, e *sense* e *antisense* de hPI(6)), utilizando-se *primers* com adaptadores para restrição com as enzimas *Sal*I e *Not*I, ou foram obtidos por extração a partir de gel de agarose (banda correspondente ao inserto de pENTR 2B-serpinb6 clivado com *Sal*II e *Not*I). O Vetor e os insertos foram submetidos à reação de ligação conforme já descrito para pENTR 2B-serpinb6. A seleção foi feita através de plaqueamento em meio seletivo (ampicilina 100µg/mL) e a checagem das colônias recombinantes foi feita por PCR de colônia ou Rinji.

4.2.3.15. Técnica de Rinji para verificação do produto da transformação

Uma alíquota de 50µL de inóculo, em meio líquido, da bactéria a ser analisada, foi tratado com 30µL de fenol e 10µL de tampão de amostra para DNA em uma placa de 96 wells. Esta placa foi centrifugada por 2 minutos em velocidade máxima e o sobrenadante foi aplicado em gel de agarose para eletroforese, para visualização dos plasmídios.

4.2.3.16. Seqüenciamento automatizado de DNA

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho foi utilizado o kit DYEnamic™ ET dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences), conforme o protocolo do fabricante e o seqüenciador ABI 377, ou o kit BigDye^R Terminator v2 cycle sequencing kit e o seqüenciador capilar ABI 3700 (Applied Biosystems).

4.2.3.17. Análise dos dados de seqüenciamento

Os cromatogramas correspondentes às seqüências obtidas através do seqüenciamento automatizado foram submetidos à análise de qualidade pela ferramenta *phred*. As seqüências de menor qualidade foram excluídas e aquelas consideradas de qualidade adequada (de média a alta) foram submetidas à ferramenta *Phrap*, um *assembler*, ou seja, um programa que monta uma seqüência consenso (*contig*) a partir de vários cromatogramas parcialmente sobrepostos da mesma seqüência.

O consenso foi montado levando-se em consideração as regiões de melhor qualidade de cada uma das seqüências, podendo-se avaliar a contribuição de cada uma das seqüências no consenso através da ferramenta *Consed*. Os programas *Phred* *Phrap* e *Consed* são rodados localmente em nossa *workstation*, apesar de estarem disponíveis na internet.

4.2.4. Geração de clones celulares e populações recombinantes

4.2.4.1. Transfecção de C6, ST1 e T98G

O plaqueamento das células C6, ST1 e T98G (2×10^6 células por P60) foi feito 24h antes da transfecção.

Foram utilizados 8,0µg do DNA de interesse e o DNA contendo o marcador para resistência à higromicina (pX343), que foi utilizado na co-transfecção, foi adicionado na proporção de 1/10 em relação ao DNA de interesse. Estes dois foram misturados com 500µL de DMEM sem SFB.

Para cada condição de transfecção foi preparado um tubo contendo 20µL de lipofectamina e 480µL de DME sem SFB.

A mistura contendo DNA foi adicionada à mistura contendo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e estes foram incubados à temperatura ambiente por 20 minutos.

A cada placa P60 foi adicionado 1mL desta mistura, o meio foi completado e as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 2% de CO₂.

Após 24h, foram feitas as diluições para isolamento dos clones estáveis (1:4, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100). A partir do momento das diluições, as células foram mantidas em meio contendo 350µg/mL de higromicina e 500µg/mL de geneticina (marcador presente no vetor onde está clonado o gene de interesse). Esta concentração de antibióticos foi decidida levando-se em conta o resultado da curva de sobrevivência a antibióticos e também o observado em transfecções anteriores.

4.2.4.2. Transfecção da linhagem empacotadora ϕ nx-ampho

Células ϕ nx-ampho foram plaqueadas em placas P60 (1,5-2,0x10⁶ células/placa), em DMEM sem antibióticos, suplementado com 10% SFB (HyClone), cerca de 16 a 24h antes da transfecção. O DNA plasmidial (5µg) foi diluído em 300µL de meio DMEM sem SFB e sem antibióticos. Em outro tubo, 20µL do reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000 – Invitrogen) foram diluídos em 300µL de meio DMEM sem SFB e sem antibióticos para cada reação de transfecção. Misturou-se o conteúdo dos dois tubos e incubou-se a mistura por 20 minutos. Após este período, adicionou-se a mistura lipossomos/DNA ao meio de cultura das células. Após 5h, foi efetuada a troca do meio para início das coletas.

Após 24h do início da transfecção, o sobrenadante de cada placa foi coletado de 12 em 12h até 72h após a transfecção. Para tanto, adicionou-se 2mL de DMEM 10% SFB em cada placa. O sobrenadante de cada coleta foi centrifugado a 1000xg por 5 minutos para eliminar restos celulares e, em seguida, foram congelados a -70°C.

4.2.4.3. Titulação dos estoques virais

Os sobrenadantes foram titulados em células NIH-3T3 plaqueadas em placas de 6 poços (10^5 células/poço) e incubadas por 12h em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Foram preparados tubos contendo 1,35mL de meio de cultura e 8µg/mL de polibreno. Ao primeiro tubo foram adicionados 150µL de sobrenadante viral e, após agitação, foram transferidos 150µL para o tubo seguinte, e assim sucessivamente, até o último tubo. O meio de cada poço da placa foi substituído por 1mL de cada diluição. Após 6h de incubação, foi adicionado 1mL de meio de cultura com SFB. No caso da construção retroviral pLPCX-EGFP, após 48h de incubação, foi feita a contagem das colônias fluorescentes, observadas em microscópio de fluorescência Nikon modelo TE-300 com filtro para fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC – excitação 460-510nm e emissão 515-565nm). Neste caso o experimento foi registrado utilizando-se câmera digital acoplada ao microscópio (RS Princeton Instruments). No caso de titulação por antibiótico, após 48h de incubação o meio foi trocado por meio de cultura contendo puromicina (1µg/mL), incubando-se as placas por 8 dias para contagem das colônias formadas.

4.2.4.4. Concentração dos estoques virais por centrifugação

Alíquotas de 1mL do sobrenadante contendo as partículas virais foram descongeladas e centrifugadas a 20.000xg a 4°C por 4h. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as partículas virais foram ressuspensas em um volume apropriado de meio DMEM 5% SFB, contendo 9µg/mL de polibreno.

4.2.4.5. Infecção de células ST1 com retrovírus

Células ST1 foram plaqueadas em placas de 96 poços (10^4 células/poço) e incubadas por 12h em meio DMEM 5% SFB. Para a

infecção, o meio de cultura foi retirado e substituído pelo sobrenadante viral concentrado, em meio DMEM suplementado com 5% SFB, contendo 9µg/mL de polibreno. Após incubação por 24h, as células foram tripsinizadas e plaqueadas novamente em uma placa de 96 poços conforme descrito acima e repetiu-se o procedimento de infecção. Após 24h da segunda infecção, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em uma placa de 24 poços. Após 12h do plaqueamento, iniciou-se a seleção com puromicina (1µg/mL), que foi feita por 3 dias. Após a seleção, as células foram mantidas até que atingissem um número suficiente para congelamento em nitrogênio líquido.

4.2.5. Análise comparativa da expressão gênica

4.2.5.1. *Northern blot*

Um gel de agarose 1%, contendo formol e MOPS foi preparado para o fracionamento das amostras de RNA preparadas pelo método de purificação em colchão de cloreto de cério. Foram aplicados de 10 a 15µg de RNA total em tampão de amostra contendo formol, formamida deionizada e MOPS. As amostras foram desnaturadas por aquecimento em banho-maria a 65°C por 10 minutos e em seguida incubadas em gelo por 2 minutos. A corrida durou cerca de 3h, até a chegada do xileno cianol do tampão de amostra à extremidade inferior do gel. Durante a corrida eletroforética, foi feita a reciclagem do tampão de corrida entre os dois compartimentos da cuba, para evitar que ocorressem distorções. Após a corrida, o gel foi corado em solução contendo brometo de etídeo e analisado em transiluminador ultra-violeta. O gel foi lavado com água *Milli-Q* até eliminação do formol e então, foi montado o aparato de transferência para membrana de nylon. Após a transferência por 16h, a membrana foi aquecida a 80°C por 2h para fixação do RNA.

A marcação das sondas foi realizada utilizando-se o kit Ready-To-Go dCTP (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante. Foram utilizados 50ng de cada sonda (produto de PCR purificado por GFX). A purificação da sonda foi feita com o kit Microspin column S300 (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante e a quantificação foi feita por medição de CPM em cintilador.

Antes da hibridização, a sonda foi aquecida a 100°C por 5 minutos para desnaturação, sendo incubada em gelo, em seguida, por 2 minutos.

A pré-hibridização foi realizada por 1h, a 65°C, com solução de hibridização (Rapid Hyb Buffer – Amersham Biosciences) pré aquecida a 65°C (7,5mL). Adicionou-se mais solução de hibridização, até o volume final de 10mL e adicionou-se a sonda marcada radioativamente. A membrana foi hibridizada por 16h a 65°C.

No dia seguinte, a membrana foi lavada com as soluções de lavagem abaixo e a radioatividade foi monitorada após a terceira lavagem com a solução II.

Solução I: 2X SSC, 0,1% SDS, 25°C por 20min

Solução II: 0,1X SSC, 0,1% SDS, 65°C por 15 minutos de 3 a 4 vezes

A membrana foi selada entre dois plásticos e exposta por pelo menos 24 h a uma tela contendo európio. O resultado foi analisado no aparelho *Storm PhosphorImager* (Molecular Dynamics)

4.2.5.2. Comparação dos níveis de transcrito de genes de interesse através de *Real Time PCR*

Nos experimentos de *Real Time PCR* foram utilizados cDNAs preparados a partir de RNA total, preparados pelo método de ultracentrifugação em colchão de cloreto de cério, extraídos das culturas dos transfectantes com construções em pDEST12.2, das populações infectadas com os retrovírus recombinantes, ou das células tratadas com ATRA por diferentes tempos. As reações de amplificação e quantificação dos produtos formados foram realizadas no termociclador ABI 5700 (Roche) do nosso Departamento de Bioquímica.

4.2.5.2.1. Desenho de *primers* para *Real Time PCR*

Como as características dos *primers* desenhados para amplificar e clonar os fragmentos de interesse são diferentes das exigidas para a reação de *Real Time PCR*, foi necessário desenhar novos *primers* para esse experimento. Os novos *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *PrimerExpress* (Applied Biosystems). As principais características destes oligos são: amplificam fragmentos cujo tamanho máximo não exceda 200pb, possuem quantidade moderada de GC (40-60%), não anelam entre si e não formam estrutura secundária, têm temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C, de acordo com o algoritmo *nearest neighbor* [141] e, são desenhados em exons diferentes para evitar eventual amplificação de contaminante de DNA genômico.

4.2.5.2.2. Padronização da concentração dos *primers*

Para a quantificação do produto formado durante a reação de *Real Time PCR* foi utilizado o reagente SYBR[®] Green Dye (Applied Biosystems). que possui afinidade pela *minor groove* da dupla fita de DNA. Quando não está ligado ao DNA, emite pouca fluorescência no comprimento de onda de 520nm, entretanto, quando se liga à

dupla fita, a fluorescência aumenta cerca de 100 vezes, permitindo então a detecção do produto do PCR em tempo real [142].

Para padronizar a concentração de *primers* utilizada na amplificação dos genes selecionados, foi utilizado como molde uma mistura de cDNAs provenientes de todas as linhagens celulares estudadas. Para cada par de *primers* foram testadas as concentrações de 200, 600 e 800nM. Assim, em cada reação foi adicionado 5µl da mistura de cDNAs, 5µl de *primers* na concentração desejada e 10µl do SYBER Green Dye. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Para esta, e todas as amplificações que foram feitas, foi utilizado o programa de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C e 40 ciclos entre 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C.

O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação são realizados pelo programa ABI-Manager SDS (Roche). Utilizando o mesmo programa, foi escolhida a concentração de *primers* que resultou na formação de quantidade mínima de *primer-dimer*, ou inexistente, e a menor variação entre as duplicatas.

4.2.5.2.3. Confirmação da expressão diferencial

Todas as reações de *Real Time PCR* foram realizadas em duplicata. Como molde, foram utilizados 3,0µL de cDNA (produto da reação de RT-PCR diluído 1/40), 3,0µL de *primer* na concentração de 600nM e 6µL do *mix* reacional. O aparelho ABI 5700 trabalha com placas de 96 poços, e todas reações foram montadas tomando-se precauções para que a placa não ficasse suja com pó, talco ou outras partículas que pudessem interferir na leitura da fluorescência.

Na análise inicial dos dados, realizada através do programa ABI-Manager SDS, foi definido, manualmente, um *threshold* que estivesse na fase exponencial de amplificação do gene (**Figura A**).

Conforme pode ser observado na **Figura A**, assim que é selecionado o *threshold* é obtido o Ct daquela amostra, a partir da intersecção deste com a curva de amplificação (*Threshold cycle*, que é definido como o ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*). Assim, temos que para um determinado *threshold*, quanto maior a concentração de um gene, mais rapidamente este é atingido e menor é o seu Ct. Consequentemente, quanto menor a sua concentração, maior o seu Ct. Portanto, podemos dizer que a diferença de expressão de um gene, que está sendo analisado em diferentes amostras, pode ser dada pela diferença dos seus Cts frente a um *threshold* (**Figura B**).

Figura A: Saída gráfica do programa ABI-Manager SDS, que mostra a fluorescência detectada em função do número de ciclos. No exemplo mostrado, para um "threshold" de 0,3 é obtido um Ct de 19,6.

Figura B: Gráfico da Fluorescência em função do número de ciclos. O Ct é dado pela intersecção do *threshold* com a curva de amplificação e o ΔCt pela diferença entre o Ct das duas curvas que estão sendo comparadas.

Quando se analisa duas ou mais amostras em um experimento de *Real Time PCR*, tem-se frequentemente uma variação da concentração de cDNA entre elas, então, para que os dados possam ser comparados é necessário que estes sejam previamente normalizados. Como método de normalização para cada amostra, a expressão do gene que está sendo estudada foi determinada em função da expressão de um gene controle, cuja expressão não deve variar entre diferentes amostras.

Assim, para cada amostra analisada foram feitas duas reações, uma utilizando *primers* para o gene de interesse e a outra utilizando *primers* para um controle interno, no caso, GAPDH. Terminada a reação, foi fornecido ao ABI-Manager SDS um *threshold* e então o programa forneceu o Ct de cada reação.

De posse dos Cts, foi calculada inicialmente a média dos Cts das duplicatas (fórmula 1) e o seu desvio padrão (fórmula 2). Como a expressão do gene foi analisada em relação a um controle interno, calculou-se a diferença entre a Média dos Cts da amostra (Mamostra) e a Média dos Cts do controle (Mcontrole). Essa diferença foi definida como ΔCt (fórmula 3). Propagando a

incerteza, temos que o desvio dessa diferença foi calculado segundo a fórmula 4.

Em seguida, foi calculado o $\Delta\Delta Ct$, que corresponde à comparação entre o ΔCt da amostra e o ΔCt da amostra tomada como referência. No nosso caso, as células transfectadas com o vetor vazio são a referência com a qual se compara o recombinante, ou as células não tratadas são o controle do tratamento.

Como em uma reação de PCR a quantidade de produto formado é duplicada a cada ciclo, os $\Delta\Delta Ct$ encontrados, que indicam diferenças entre ciclos, não refletem diretamente a diferença de produto entre as amostras, visto que uma diferença $\Delta\Delta Ct=1$ ciclo, por exemplo, indica que a diferença de quantidade de produto entre estas amostras é de duas vezes, e não de uma vez. Assim, partindo do princípio de que a cada ciclo a quantidade de produto é dobrada, para calcular a diferença de produto entre as amostras (*ratio*) é necessário que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado à potência do inverso de $\Delta\Delta Ct$, ou seja, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fórmula 6) [143].

A partir desses cálculos, foi possível analisar a diferença de formação do produto do PCR, que está diretamente ligado à abundância do gene entre as linhagens ou condições analisadas.

$$(1) \quad M(média) = \frac{M + M'}{2}$$

$$(2) \quad \sigma(desvio) = \sqrt{\frac{2(Ct^2 + Ct'^2) - (Ct + Ct')^2}{4}}$$

$$(3) \quad \Delta Ct = M_{amostra} - M_{controle}$$

$$(4) \quad \sigma_{final} = \sqrt{\sigma_{amostra}^2 + \sigma_{controle}^2}$$

$$(5) \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{amostra \text{ de referência}}$$

$$(6) \quad ratio_{relativo \text{ a amostra de referência}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Fórmulas: Fórmulas utilizadas para análise dos dados do *Real Time PCR*. As fórmulas dos desvios e da média (1, 2 e 4) já estão adaptadas para um espaço amostral $n=2$ e, em todas as amostras, Ct e Ct' são relativos ao Ct encontrado para uma determinada amostra e sua duplicata.

4.2.6. Análise de fenótipo dos clones celulares e de populações recombinantes geradas

4.2.6.1. Curvas de crescimento celular

Foram plaqueadas 5×10^4 células de cada linhagem ou condição estudada, em placas de 35mm. O meio de cultura foi renovado a cada 3 dias. No dia seguinte ao plaqueamento e a cada 2 dias após o primeiro dia, duplicatas das culturas de cada condição foram coletadas através de tripsinização e fixadas em solução de formaldeído a 3,7%. A contagem das suspensões de células foi realizada com o auxílio de um contador eletrônico modelo CC530 da CELM.

4.2.6.2. Crescimento em suspensão de agarose

Foram utilizadas soluções de agarose (1,2% e 0,6%), DMEM 2X e SFB. A agarose foi derretida e mantida em banho-maria a 45°C. Foram misturados DMEM 2X, SFB e 1,2% de agarose, de modo a obter a chamada agarose dura (0,6% de agarose em DMEM com 10% SFB). Esta solução foi distribuída em bandejas de 24 poços (0,5mL/poço). A agarose semi-sólida (0,3% de agarose em meio com 10% SFB) foi mantida no banho-maria a 45°C. Uma suspensão de células foi preparada de modo a se obter células bem isoladas, para garantir que cada colônia se originasse de uma única célula. Diluições seriadas desta suspensão de células foram feitas, distribuindo-se as células em duplicata nos poços (10^3 ou 10^2 células por poço), sobre a agarose dura. Rapidamente, colocou-se a agarose semi-sólida por cima das células. Após completa gelificação, a bandeja foi incubada a 37°C. No dia seguinte foi adicionado 0,5mL de meio de cultura líquido em cada poço (2 ou 10% SFB, com ou sem ATRA). O meio de cultura líquido foi renovado a cada 3 dias e ao final de 2 semanas, as colônias foram fixadas com formaldeído e analisadas com o auxílio de um microscópio Nikon Diaphot invertido em contraste de fase. O crescimento foi quantificado através da contagem do número de colônias desenvolvidas em relação ao número de células plaqueadas (eficiência de plaqueamento em suspensão).

4.2.6.3. Ensaio de incorporação de timidina

Foram plaqueadas 6×10^3 células/poço em uma bandeja de 96 poços, em meio de cultura adequado. As culturas receberam o tratamento adequado e 6h antes da lise (lise em 24h), foi adicionado timidina tritiada ao meio de cultura (na concentração final de $0,25\mu\text{Ci/mL}$ e 10^{-7}M de timidina fria), para incorporação ao DNA. O meio de cultura foi removido e as culturas foram lisadas com 0,4mL/poço de NaOH 0,5M e incubadas a 37°C por 30 minutos.

A coleta do material foi feita utilizando-se o equipamento Combi 12 Cell Harvester (Molecular Devices). Após secagem em estufa, cada filtro foi colocado em frascos de cintilação (numerados) com 3ml de líquido de cintilação/frasco e a radioatividade incorporada ao DNA foi medida em um contador de cintilação (Hewlett-Packard).

4.2.6.4. Ensaio de MTT

Foram plaqueadas 6×10^3 células/poço em uma bandeja de 96 poços, em meio de cultura adequado. As culturas receberam o tratamento adequado por 24h. Após 20h de tratamento, foram retirados 100 μ L do meio de cultura de cada poço e foram adicionados 5 μ L da solução de MTT (estoque 10mg/mL). A placa foi envolvida em papel alumínio para proteger da luz e incubada na estufa de cultura de células a 37°C por 4h. Após a incubação, o meio de cultura foi totalmente removido, foram adicionados 200 μ L de DMSO por poço e a placa foi agitada em vortex, utilizando-se a velocidade mínima por 10 minutos. A leitura foi feita a 570nm no leitor de placa de ELISA SoftMax.

4.2.7. Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O número de repetições variou para cada experimento, sendo no mínimo duas repetições. As diferenças entre as médias dos grupos foi testada por ANOVA, seguido pelos testes Tukey, ou t de student. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Prism, versão 3.03 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1. Análise do efeito de ATRA em células ST1 através de técnicas de Proteoma

5.1.1. Geração de perfis bidimensionais de extrato total de células ST1 marcadas metabolicamente com metionina radioativa

As amostras de células ST1 tratadas com 10^{-5} M ATRA por 10h e controle (não tratadas) foram preparadas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. O método de normalização da quantidade de extrato aplicado em cada fita foi a contagem de emissão radioativa da metionina incorporada. Para o extrato correspondente ao tratamento, a média da contagem de material TCA precipitável obtida foi de $2,63 \times 10^4$ cpm/ μ L, e para o extrato controle a média da contagem foi de $2,47 \times 10^4$ cpm/ μ L. Foram aplicados $1,85 \times 10^6$ cpm por fita de 18cm pH 3-10NL, em volume final de 350 μ L, respeitando a recomendação de não utilizar volume de amostra maior que $\frac{1}{4}$ do volume total de reidratação. A detecção dos *spots* foi realizada por exposição dos perfis à tela de európio do *Storm PhosphorImager*. O experimento foi realizado em duplicata técnica tendo sido possível obter perfis bidimensionais com boa resolução e alta reprodutibilidade entre as duplicatas (80%). Houve apenas baixa resolução de isoeletrofocalização na região básica da fita, uma limitação inerente à técnica. A quantidade de proteínas aplicada por gel foi suficiente para a detecção e resolução desejadas. Um perfil correspondendo ao controle e um perfil correspondendo às células tratadas com ATRA estão representados nas **Figuras 1 e 2**.

Figura 1: Perfil bidimensional de extrato total de células ST1 controle (não tratadas), marcadas metabolicamente com metionina radioativa.

Figura 2: Perfil bidimensional de extrato total de células ST1 tratadas com 10⁻⁵M ATRA por 10h, marcadas metabolicamente com metionina radioativa.

5.1.2. Geração de perfis bidimensionais das frações nucleares e citoplasmáticas de ST1

As células ST1 foram tratadas com ATRA por 10h e os extratos enriquecidos para proteínas nucleares foram preparados como descrito em Materiais e Métodos. A normalização da quantidade de proteínas aplicada por fita foi feita por quantificação espectrofotométrica de proteínas (Método de Bradford). Géis analíticos foram preparados utilizando-se 20µg de proteína e géis preparativos utilizando-se concentrações variando de 50 a 150µg.

No mesmo processo de obtenção de proteínas nucleares, a fração correspondente às proteínas citoplasmáticas foi isolada e após dessalinização, foi utilizada para gerar perfis bidimensionais. Nas **Figuras 3 e 4** estão representados perfis bidimensionais de extratos nucleares de células ST1 tratadas com 10^{-5} M ATRA por 10h e controle e nas **Figuras 5 e 6** pode-se observar perfis de extrato citoplasmático, nas mesmas condições. Para a fração citoplasmática foram preparados apenas géis analíticos, com 20µg de proteína e os perfis foram corados com prata. Para a fração nuclear, foram gerados perfis analíticos e preparativos, corados com prata ou Coomassie Blue coloidal.

Figura 3: Perfil bidimensional de extrato nuclear de células ST1 controle (não tratadas), corado com prata.

Figura 4: Perfil bidimensional de extrato nuclear de células ST1 tratadas com 10-5M ATRA por 10h, corado com prata.

Figura 5: Perfil bidimensional de extrato citoplasmático de células ST1 controle (não tratadas), corado com prata.

Figura 6: Perfil bidimensional de extrato citoplasmático de células ST1 tratadas com 10⁻⁵M ATRA por 10h, corado com prata.

5.1.3. Análise dos perfis bidimensionais de extratos nucleares

Foram gerados quatro pares de géis (quatro perfis para o controle e quatro perfis para o tratamento com 10^{-5} M ATRA por 10h) correspondendo à fração citoplasmática e quatro pares correspondendo à fração nuclear. Os perfis bidimensionais gerados foram escaneados em escaner de mesa de dois braços, que capta a imagem por transmitância e, portanto permite densitometrar os spots.

Após a obtenção das imagens, estas foram analisadas com o auxílio do programa 2D Elite (Amersham Biosciences). As análises se restringiram aos perfis correspondentes à fração nuclear. Dois perfis de cada condição foram analisados com o auxílio deste programa e os outros dois perfis foram utilizados somente para confirmação dos resultados por observação. Foram considerados para identificação, spots cuja intensidade variou seguindo um mesmo padrão em pelo menos dois pares de perfis e cuja variação pode ser observada visualmente, confirmando os resultados da densitometria. As comparações foram feitas com base no volume normalizado dos spots. O volume de um *spot* específico é calculado multiplicando-se sua densidade óptica, após subtração do *background*, pela sua área. O volume normalizado de um *spot* equivale ao volume deste *spot*, dividido pela soma dos volumes de todos os spots detectados no mesmo perfil, multiplicado por 100.

Cada perfil continha cerca de 300 spots, e a reprodutibilidade das duplicatas foi de cerca de 70%. A análise semi-automática, baseada na densitometria e na comparação automática de perfis (*matching automático*) mostrou cerca de 45 spots presentes no gel como sendo de interesse para identificação. O uso dos critérios descritos, de só considerar o que seguisse o mesmo padrão em pelo menos dois pares e fosse possível observar visualmente, restringiu a população de spots de interesse para nove. Dentre os nove spots

de interesse, cinco seguem o mesmo padrão de regulação em pelo menos três pares de géis e quatro seguem este padrão em pelo menos dois pares. Na **Figura 7** estão representadas as regiões de interesse de dois pares de perfis e o resultado da densitometria dos *spots* de interesse pode ser visto na **tabela I**. A **tabela II** traz o resultado da identificação do *spots* por espectrometria de massa.

Foi gerado um par de perfis de extrato nuclear de células ST1 tratadas com 10^{-5} M ATRA por 24h e controle (não tratadas), tendo sido possível observar que a regulação dos *spots* de interesse analisados nos perfis de 10h está exacerbada no perfil de 24h (perfis não mostrados).

Figura 7: Pares de géis (duplicata técnica e biológica) mostrando spots que foram selecionados para análise por espectrometria de massa por sua expressão ser visivelmente regulada em pelo menos dois pares de géis.

Tabela I: Volume normalizado dos spots de interesse.

SPOT	CONTROLE A	CONTROLE B	ATRA A	ATRA B
1	2,473	2,721	1,242	1,210
2	1,184	1,273	0,115	0,290
3	1,265	1,448	0,110	0,098
4	0,786	0,722	0,215	0,190
5	2,672	2,774	3,320	3,282
6	0,115	0,100	0,320	0,305
7	0,963	0,887	0,318	0,308
10	0,788	0,664	0,127	0,115
11	1,290	1,287	2,008	2,015

Tabela II: Identificação dos *spots*, seus sinônimos e o efeito de ATRA (+ATRA) sobre sua abundância. Nomes em destaque correspondem aos utilizados na discussão dos resultados.

SPOT	IDENTIFICAÇÃO	SINÔNIMOS	+ATRA
2	<i>c-fos</i>	-	inibido
3	stem cell growth factor	<i>SCGF</i>	inibido
4	translationally controlled tumor protein	<i>TCTP</i> , fortilina, p23, HRF	inibido
5	<i>actina</i>	-	induzido
6	78kDa glucose regulated protein	<i>GRP78</i> , ORP 80, BiP	induzido
7	tubulina cadeia beta-5	-	inibido
11	heat shock cognate 71kDa protein	<i>Hsc70</i> , Hspa8, Hsc73	induzido

5.1.4. Espectrometria de massa (*mass fingerprinting*) dos *spots* de interesse

Para a identificação, os *spots* de interesse foram excisados dos próprios géis analíticos, ou de géis preparativos contendo maior massa de proteínas e corados com Coomassie Blue coloidal, os quais foram gerados especificamente para análise. Cada *spot* foi submetido ao processo de identificação quatro vezes, até que um espectro de boa qualidade fosse obtido. Algumas vezes, o mesmo *spot* foi excisado de diferentes géis e processado em conjunto, para aumentar a quantidade de proteína por análise. O processamento desde a excisão do gel, até a análise por MALDI-TOF foi realizado de acordo com o protocolo descrito em Materiais e Métodos. Como se pode ver nas **Figuras de 8 a 15**, foi possível identificar 7 dos 9 *spots* de interesse. O *spot* de número 1, apesar de ser um *spot* bastante abundante e presente como regulado em todos os perfis obtidos, não pode ser identificado porque não foi possível obter um espectro de boa qualidade nas diversas tentativas feitas. O *spot* de número 2 se mostrou como uma mistura de proteínas em todas as tentativas de análise. Todas as análises foram feitas antes e depois de purificação em microcolunas de C18 (*zip tips*). A imagem do espectro correspondente ao *spot* 3 foi perdida por problemas com o computador, mas os valores de massa dos picos encontrados estão na figura correspondente. Nas figuras abaixo, os valores de massa destacados em cor diferente correspondem às massas que foram encontradas na proteína identificada, assim como as seqüências de aminoácido destacadas correspondem aos picos identificados. Os programas utilizados na identificação foram o PeptIdent (<http://www.expasy.org/tools/peptident.html>) ou o Aldente (<http://www.expasy.org/tools/aldente/>)

spot 2: c-fos

Score: 0.26, 5 matching peptides: [P12841](#) (FOS_RAT) pI: 4.81, Mw: 40926.60
 Proto-oncogene protein c-fos (Cellular oncogene fos). - Rattus norvegicus (Rat).

[GlycoMod](#) [FindMod](#) [FindPept](#) [PeptideMass](#) [BioGraph](#)

user mass	matching mass	Δmass (Dalton)	#MC	modification	position	peptide
1036.512	1036.5139	0.0019	2	1xMSO	149-157	MAAAKCRNR
1107.546	1107.551	0.005	2	1xCys_PAM, 1xMSO	149-157	MAAAKCRNR
1300.57	1300.7471	0.1771	0		177-188	SALQTEIANLLK
1657.933	1657.8391	-0.0938	2		126-139	RGKVEQLSPPEEEK
1657.933	1657.8391	-0.0938	2		127-140	GKVEQLSPPEEEKR
2384.103	2384.1153	0.0123	0		266-287	AEPFDDFLFPASSRP SGSETAR

ΔpI: 0.01, ΔMw: 4926.6 Da (13.7%)
 15.3% of sequence covered:

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1 mmfsgfnady easssrcssa spagdslyy hspadsfssm gspvntqdfc adlsvssanf 60
61 iptvtaiats pdlqlwlvqpt lvssvapsqt raphpyglpt pstgayarag vvktnsggra 120
121 qsigrRGKVE QLSPEEEER rirrernkMA AAKCRNRrre ltdtlqaetd qledekSALQ 180
181 TEIANLLKek eklefilaah rpackipndl gfpeemsvts ldltgglpea ttpeseeaft 240
241 lpllndpepk pslepvnkis nmelkAEPFD DFLFPASSRP SGSETARsvp dvdlsgsfya 300
301 adweplhsss lgmgpmvte lplctpvvtc tpscttytss fvftypeads fpscaaaahrk 360
361 gsssnepssd slsptllal
  
```

Figura 8: Espectro de MALDI-TOF do *spot* 2. Identificação utilizando o programa PeptIdent.

spot 3: Stem cell growth factor

	spot 3	
pI (observado)	4,9 ± 0,1	842.726
MW (observado)	36 ± 2kDa	870.762
		877.258

Score: 0.64, 9 matching peptides: [Q88201](#) (SCGF_RAT) pI: 5.16, Mw: 34173.83
CHAIN 1: Stem cell growth factor - Rattus norvegicus (Rat).

[GlycoMod](#) [FindMod](#) [FindPept](#) [PeptideMass](#) [BioGraph](#)

user mass	matching mass	Δ mass (Dalton)	#MC	modification	position	peptide
842.726	842.3751	-0.3508	0		172-178	SEQEHGR
1045.847	1045.5823	-0.2646	1	Cys_CAM: 182	179-187	LEGCLKGLR
1235.914	1235.5805	-0.3334	0	Cys_PAM: 324	320-328	LYFVCEFPF
1476.142	1476.7289	0.5869	1		153-166	DAASDTRDSVQALK
1494.096	1494.8573	0.7613	2	Cys_PAM: 182	179-191	LEGCLKGLRLGHK
1569.108	1568.7816	-0.3263	1		251-263	RSEGLYLFENGQR
1665.054	1665.8126	0.7586	2		198-212	DFETQAAAQARCKAR
2211.814	2212.2006	0.3866	1		44-64	ESLMLKNLQALGLP TGVGNK
2300.55	2300.1274	-0.4225	2	2xCys_PAM	192-210	CFLLSRDFETQAAAQ ARCK

Δ pI: 0.36, Δ Mw: 1826.2 Da (5.1%)
31.9% of sequence covered:

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1      |      |      |      |      |      |
61  VGNKdnlaen segkevweat etqgeeeeee ttttppsspt pfpspsptse dtvttyilgrl 120
121 asldaglhql hirlhvldtr vveltqglrr lrDAASDTRD SVQALKevqv rSEQEHGRLE 180
181 GCLKGLRLGH KCFLLSRDFE TQAAAQARCK ARggslaqp drqqrndalsr ylraalapyn 240
241 wpvwlghvhdr RSEGLYLFEN GQRvsffawh ralspesgaq psaashplsp dqpnnggilen 300
301 cvaqasddgs wwdhdcerrL YFVCEFPF

```

Figura 9: Resultado da análise MALDI-TOF do spot 3. Identificação utilizando o programa PeptIdent.

spot 4: Translationally controlled tumor protein

1) [P63029](#) TCTP_RAT [Up](#)

Translationally controlled tumor protein (TCTP) (Lens epithelial protein).

Swiss-Prot : Rattus norvegicus : [10116](#)

pValue	Z-score	Score	Mw	pI	Hits	Coverage	Shift (Da)	Slope (ppm)
3e-11	4.63	1.24	19462	4.76	6	30%	0.041671	80

Exp	Theo	Intensity			Delta		Dev	MC	CAM	MSO	PTM	Position		Sequence
Da	Da	UI	%	rank	Da	ppm	ppm					start	end	
695.487	695.390882	1	100	1	0.10	138	-1	-	-	0/1		1	5	MIIVR
1432.838	1432.698792	1	100	1	0.14	97	-11	-	1/1	-		22	34	EIADGLCLEVEGK
1028.678	1028.537078	1	100	1	0.14	137	16	-	-	-		103	110	LEEQKPER
1419.942	1419.76642	1	100	1	0.18	124	14	-	-	0/1		111	123	VKPFMTGAAEQIK
1435.899	1435.761334	1	100	1	0.14	96	-12	-	-	1/1		111	123	VKPFMTGAAEQIK
1446.89	1446.69734	1	100	1	0.19	133	24	-	-	1/1		153	164	EDGVTPFMIFFK

[View all couples \(1 outliers\)](#)

```

1  MIIVRdlis delfsdiyki rEIADGLCLE VEGKmsvste gaiddsligg nasaegpege gtestvvtgv divmnhhlqe
81 tsftkeaykk yikdymkslk gkLEEQKPER VKPFMTGAAE QIKhilanf nqffigenm npdgmvalld yrEDGVTPFM
161 IFFKdgleme kc

```

Figura 10: Espectro de MALDI-TOF do spot 4. Identificação utilizando o programa Aldente.

spot 5: Actin

Figura 11: Espectro de MALDI-TOF do spot 5. Identificação utilizando o programa PeptIdent.

spot 6: 78 kDa glucose-regulated protein

Score: 0.67, 6 matching peptides: [P06761](#) (GR78_RAT) pI: 5.01, Mw: 70474.59

CHAIN 1: 78 kDa glucose-regulated protein. - Rattus norvegicus (Rat).

[GlycoMod](#) [FindMod](#) [FindPept](#) [PeptideMass](#) [BioGraph](#)

user mass	matching mass	Δmass (Dalton)	#MC	modification	position	peptide
997.425	997.5174	0.0924	0		298-306	ALSSQHQR
1191.642	1191.6368	-0.0051	0		465-474	VYGERPLTK
1228.623	1228.628	0.005	0		50-60	VEIANDQGNR
1430.655	1430.691	0.036	0		102-113	TWNTPSVQQDIK
1566.774	1566.7798	0.0058	0		61-74	ITPSYVAFTPEGER
1677.789	1677.8079	0.0189	0		82-96	NQLTSNPENTVFDK

ΔpI: 0.29, ΔMw: 1525.4 Da (2.1%)
11.2% of sequence covered:

```

1      11      21      31      41      51
|      |      |      |      |      |
1      ee edk kedvgtv vgidlg ttys cvgvfk ngrV EIIANDQGNR 60
61 ITPSYVAFTP EGERligdaa kNQLTSNPEN TVFDKrlig rTWNTPSVQQ DIKflpfkvv 120
121 ekktkpyiqv digggqtktf apeeisamvl tkmketaeay lgkvthavv tvpayfndaq 180
181 rqatkdagti aglnvmriin eptaaaiaay ldkregekni lvfdlgggtf dvalitidng 240
241 vfevvatngd thlggedfdq rvmehfikly kkkktgkdvrk dnraqqlrr evekakraLS 300
301 SQHQRieie sffegedfse tltrakfeel nmldlfrstmk pvqkvledsd lkksdideiv 360
361 lvvgstripk iqqlvkeffn gkepsrginp deavaygaav qagvlsqdqd tgdvlvldvc 420
421 pltlgietyg gvmtkliprn tvvptkksqi fstaadnqpt vtikVYGER PLTKdnhlilg 480
481 tfdlgtgippa prgvpqievt feidvngilr vtaedkgtgn knkititndq nrltpeeier 540
541 mvndaekfae edkklkerid trnelesyay slknqigdkc klggklsped ketmekavee 600
601 kiewleshqd adiedfkakk keleeivqpi isklysgggp pptgeedtse kdel

```

Figura 12: Espectro de MALDI-TOF do spot 6. Identificação utilizando o programa PeptIdent.

Spot 6z: 78 kDa glucose-regulated protein

Score: 0.54, 7 matching peptides: [P06761](#) (GR78_RAT) pI: 5.01, Mw: 70474.59
 CHAIN 1: 78 kDa glucose-regulated protein. - Rattus norvegicus (Rat).

[GlycoMod](#) [FindMod](#) [FindPept](#) [PeptideMass](#) [BioGraph](#)

user mass	matching mass	Δ mass (Dalton)	#MC	modification	position	peptide
1430.555	1430.691	0.136	0		102-113	TWNDPSVQQDIK
1460.681	1460.7591	0.0781	0		354-367	SDIDEIVLVGGSTR
1566.702	1566.7798	0.0778	0		61-74	ITPSYVAFTPEGER
1677.758	1677.8079	0.0499	0		82-96	NQLTSNPENTVFDK
1887.941	1887.9712	0.0302	0		165-181	VTHAVVTVPAYFNDA QR
1933.975	1934.013	0.038	0		475-492	DNHLLGTDLTGIPP APR
2148.948	2148.9971	0.0491	0		307-324	IEIESFFEGEDFSET LTR

Δ pI: 0.29, Δ Mw: 1525.4 Da (2.1%)
 17.0% of sequence covered:

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1      ee edkkedvgtv vgidlgttys cvgvfkngvr eiilandqgnr 60
61  ITPSYVAFTP EGERligdaa kNQLTSNPEN TVFDAKrlig rTWNDPSVQQ DIKflpfkvv 120
121 ekktkpyiqv digggqtktf apeeisamvl tknketaeay lgkkVTHAVV TVPAYFNDAQ 180
181 Rqatkdagti aglnvmriin eptaaaiayg ldkregekni lvfdlgggtf dvslltidng 240
241 vfevvatngd thlggedfdq rvmehtfikly kkkgtgkdvrk dnravqklrr evekakrales 300
301 sqhqrIEIE SFFEGEDFSE TLTRakfeel nmdlfrstmk pvqkvledsd lkkSDIDEIV 360
361 LVGGSTRipk iqqlvkeffn gkepsrginp deavaygaav qagvlsgdqd tgdvlldvc 420
421 pltlgietyg gvmtkliprn tvvptkksqi fstaadnqpt vtikvyeger pltkDNHLLG 480
481 TFDLTGIPPA PRgvppievt feidvngilr vtaedkgtgn knkititndq nrltpeeier 540
541 mvndaekfae edkklkerid trnelesyay slknqigdke klggklsped ketmekavee 600
601 kiewleshqd adiedfkakk keleeivqpi isklygsggp pptgeedtse kdel
  
```

Figura 13: Espectro de MALDI-TOF do spot 6 após dessalinização com *zip tips*. Identificação utilizando o programa PeptIdent.

spot 7: Tubulin beta-5 chain

Score: 0.58, 7 matching peptides: [P69897](#) (TBB5_RAT) pI: 4.78, Mw: 49670.82

Tubulin beta-5 chain - Rattus norvegicus (Rat).

[GlycoMod](#) [FindMod](#) [FindPept](#) [PeptideMass](#) [BioGraph](#)

user mass	matching mass	Δmass (Dalton)	#MC	modification	position	peptide
1039.592	1039.5935	0.0015	0		310-318	YLTVAAVFR
1130.608	1130.5953	-0.0126	0		242-251	FPGQLNADLR
1143.691	1143.6343	-0.0566	0		253-262	LAVNMVFFPR
1159.512	1159.6292	0.1172	0	MSO: 257	253-262	LAVNMVFFPR
1245.501	1245.5932	0.0922	0	MSO: 388	381-390	ISEQFTAMFR
1615.916	1615.836	-0.0799	0		63-77	AILVDLEPGTMDSVR
1959.004	1958.9818	-0.0221	0		104-121	GHYTEGAELVDSVLD VVR

ΔpI: 0.42, ΔMw: 670.8 Da (1.4%)

16.2% of sequence covered:

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1 mreiwhiqag qcgngigakf wevisdehgi dptgtyhgds dlqldrisvy yneatggkyy 60
61 prAILVDLEP GTMDSVRsgp fgqifrpdnf vfgqsgagnn wakGHYTEGA ELVDSVLDVV 120
121 Rkeaescdcl qgfqlthslg ggtgsgmgtl liskireeyp drimntfsvv pspkvsdtvv 180
181 epynatlsvh qlventdety cidnealydi cftrlklttp tygdlnhlvs atmsgvttcl 240
241 rFPGQLNADL RkLAVNMVFP PRlhffmpgf apltsrgsqq yraltvpelt qqvfdaknmn 300
301 aacdprhgrY LTVAAVFRgr msmkevdeqm lnvqknkssy fvewipnnvk tavcdipprg 360
361 lkmavtfign staiqelfkr ISEQFTAMFR rkafihwytg egndemefte aesnmndlvs 420
421 eyqqyqdata eeedfgeea eeea

```

Figura 14: Espectro de MALDI-TOF do spot 7. Identificação utilizando o programa PeptIdent.

spot 11: Heat shock cognate 71kDa protein

Score: 0.60, 6 matching peptides: [P63018](#) (HS7C_RAT) pI: 5.37, Mw: 70871.07
Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8). - Rattus norvegicus (Rat).

[GlycoMod](#) [FindMod](#) [FindPept](#) [PeptideMass](#) [BioGraph](#)

user mass	matching mass	Δmass (Dalton)	#MC	modification	position	peptide
1199.61	1199.6742	0.0642	0		160-171	DAGTIAGLNVLRL
1253.616	1253.6161	0.0001	0		302-311	FEELNADLFR
1487.715	1487.7013	-0.0136	0		37-49	TTPSYVAFTDTER
1691.679	1691.7256	0.0466	0		221-236	STAGDTHLGGEDFDNR
1982.059	1981.9978	-0.0611	0		138-155	TVTNAVVTVPAYFND SQR
2774.195	2774.3268	0.1318	0		424-447	QTQTFTTYSNQPQGV LIQVYEGER

ΔpI: 0.33, ΔMw: 1128.9 Da (1.6%)

14.4% of sequence covered:

```

1      11      21      31      41      51
|      |      |      |      |      |
1 mskgpavgid lgttyscvgv fqhghkveia ndqgnrTTPS YVAFTDTERl igdaaknqva 60
61 mnptntvfda krligrrfdd avvqsdmkhw pfmvndagr pkvqvveykge tksfypeeys 120
121 smvltkmkei aeaylgkTVT NAVVTVPAYF NDSQRqatkD AGTIAGLNVL Riineptaaa 180
181 iayglldkkvg aernvlifdl gggtfdvsil tiedgifevk STAGDTHLGG EDFDNRmvnh 240
241 fiaefkrkhk kdisekkrav rrlrtacera krtlsstqa sieidslyeg idfytsitra 300
301 rFEELNADLF Rgtldpveka lrdakldksq ihdivlvvgs tripkiqkl qdffngkeln 360
361 ksinpdeava ygaavqaail sgdkseenvqd lllldvtpls lgietaggvm tvlikrntti 420
421 ptkQTQTFTT YSDNQPGVLI QVYEGERamt kdnnllgkfe ltgippaprg vpqievtfdi 480
481 dangilnvsa vdkstgkenk ititndkgrl skediermvq eaekykaede kqrdkvsskn 540
541 slesyafnmk atvedeklqg kindedkqki ldkcneiisw ldknqtake efehqqkele 600
601 kvcnpiitkl yqsaggmpgg mpggfpggga psggassgp tieevd

```

Figura 15: Espectro de MALDI-TOF do spot 11. Identificação utilizando o programa PeptIdent.

5.2. Análise do efeito de ATRA em T98G através de técnicas de Proteoma

Para verificar o efeito de 10^{-5} M ATRA sobre as células T98G, foram gerados perfis bidimensionais de extratos nucleares destas células tratadas por 24h e controle (não tratadas), em triplicata. Os perfis foram corados com prata e escaneados em equipamento adequado. A análise de imagem foi feita com o programa 2D Elite (Amersham Biosciences), entretanto não foi possível encontrar *spots* cuja intensidade fosse significativamente regulada pelo tratamento. Nas **Figuras 16 e 17** estão representados um par de perfis corados por prata. As poucas alterações aparentes neste par não se reproduzem na triplicata.

Nas **Figuras 18 e 19** estão representados um par de perfis bidimensionais de extrato celular total de T98G tratadas com 10^{-5} M ATRA por 24h e controle (não tratadas). Estes perfis foram corados com Coomassie Blue Coloidal, porém da mesma forma não foi possível encontrar *spots* significativamente regulados pelo tratamento com ATRA. Mesmo havendo distorções no perfil da **Figura 17**, foi possível fazer a análise de imagem sem comprometimento, levando-se em consideração referências internas. Por não apresentar *spots* de interesse, estes perfis foram desconsiderados para a continuação das análises.

Figura 16: Perfil bidimensional de extrato nuclear de células T98G controle (não tratadas), corado com prata.

Figura 17: Perfil bidimensional de extrato nuclear de células T98G tratadas com 10-5M ATRA por 24h, corado com prata.

Figura 18: Perfil bidimensional de extrato total de células T98G controle (não tratadas), corado com Coomassie Blue coloidal

Figura 19: Perfil bidimensional de extrato total de células T98G tratadas com 10-5M ATRA por 24h, corado com Coomassie Blue Coloidal.

5.3. Análise do nível de expressão de serpinb6 e hPI(6) em linhagens celulares de glioma tratadas com ATRA

O nível de indução de serpinb6 induzido por ATRA em células ST1 e C6, e do homólogo humano hPI(6) em células T98G e A172 foi analisado por *Northern blot* e *Real Time PCR*. *Northern blot* foi utilizado na análise das linhagens de rato e *Real Time PCR* na análise das linhagens humanas. Todas as linhagens foram tratadas com 10^{-5} M ATRA, pelo tempo especificado nos gráficos. Para as células C6, a concentração de SFB utilizada durante o tratamento foi de 5% e para as células ST1 o experimento foi realizado na presença de 5% ou 2% SFB. Para as linhagens humanas foi mantido 10% SFB durante todo o tratamento.

Foi possível confirmar dados prévios de outros projetos desenvolvidos no laboratório, mostrando que serpinb6 é induzido pelo tratamento com ATRA nas linhagens C6 e ST1 (**Figuras 20 e 21**).

Nas células de glioma humano T98G e A172, não foi possível observar o mesmo efeito indutivo de ATRA (**Figuras 22 e 23**).

O resultado do ensaio de *Northern blot* é representativo de três experimentos independentes e o ensaio de *Real Time PCR* foi realizado três vezes, cada uma das quais em duplicata.

O resultado do ensaio de *Northern blot* foi normalizado apenas pelo nível de GAPDH de cada amostra, representando, portanto, valores absolutos de abundância dos transcritos nos diferentes períodos de tempo testados. No caso do resultado do *Real Time PCR*, de acordo com o que foi descrito em Materiais e Métodos, além da normalização pela abundância de GAPDH em cada amostra, o nível de expressão representado nos gráficos é sempre relativo à alguma amostra controle. Nos gráficos correspondentes à cinética de indução de hPI(6) por ATRA, o nível de expressão é dado em função do controle para cada ponto, considerado como sendo igual a 1.

Figura 20: Cinética de expressão de serpinb6 de rato induzido por ATRA na linhagem ST1. Análise por Northern blot em duas concentrações de SFB. Resultado normalizado pelo nível de GAPDH de cada amostra.

Figura 21: Cinética de expressão de serpinb6 de rato induzido por ATRA na linhagem C6. Análise por Northern blot. Resultado normalizado pelo nível de GAPDH de cada amostra

Figura 22: Cinética de expressão de hPI(6) induzido por ATRA na linhagem T98G. Análise por Real Time PCR normalizado pelo nível de expressão de GAPDH. Nível de expressão relativa ao controle de cada par.

Figura 23: Cinética de expressão de hPI(6) induzido por ATRA na linhagem A172. Análise por Real Time PCR normalizado pelo nível de expressão de GAPDH. Nível de expressão relativa ao controle de cada par.

5.4. Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos genes de interesse

5.4.1. Amplificação da porção codificante completa e de um fragmento *antisense* de *serpinb6* de rato

As células ST1 foram cultivadas em uma placa P150 até confluência de 80% e lisadas para extração de RNA. Este lisado foi submetido a ultracentrifugação em colchão de cloreto de cério para purificação de RNA total. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro e 2,0µg foram utilizados em reação de RT-PCR com *primers* do tipo oligo d(T). A qualidade do cDNA gerado desta forma foi testada em reações de PCR para amplificação de fragmentos correspondentes aos genes GAPDH, Notch2 e MLH1. A amplificação de GAPDH é geralmente utilizada como controle por se tratar de um gene expresso ubiquamente e ter abundância grande e constante. A amplificação de Notch2 mede a capacidade de amplificação de transcritos longos, a partir do cDNA em teste e MLH1 só é amplificado quando há contaminação com DNA genômico [100, 144]. O resultado destas amplificações mostrou que o cDNA de ST1 obtido é de boa qualidade (Figura não mostrada).

Para amplificação de *serpinb6* de rato, inicialmente foram utilizados os *primers* mSPI3F e mSPI3R desenhados com base nas seqüências de *spi3* de camundongo para amplificar o homólogo de rato, uma vez que a seqüência de rato ainda não estava descrita. Porém, apesar das diversas tentativas, e do ajuste de todas as condições possíveis, como concentração de magnésio na reação, gradiente de temperatura de anelamento dos *primers*, adição de DMSO e betaína e desenho de *primers* para reação de RACE (SMART RACE, Clontech), não foi possível amplificar este fragmento de rato.

Com a disponibilização de ESTs de rato no *GenBank*, *primers* específicos foram desenhados e com estes (rSPI3F e rSPI3R), foi

possível amplificar com sucesso a porção codificante completa de *serpinb6* de rato, contendo 1.140 pb. Um fragmento da região 5' da porção codificante deste gene, contendo 474 pb foi também amplificado com sucesso, para a obtenção de uma construção *antisense*, utilizando-se os *primers* 5ANTISPI3 e 3ANTISPI3. Estes fragmentos amplificados contêm em suas extremidades adaptadores para clivagem com as enzimas de restrição *Sall* e *NotI*, sítios que foram utilizados para as clonagens.

Figura 24:

a) Amplificação da porção codificante completa de *serpinb6* de rato, utilizando-se os *primers* rSPI3F e rSPI3R e cDNA preparado a partir de RNA total de ST1 como molde em reação de PCR. Eletroforese em gel de agarose 1%. M corresponde ao marcador de peso molecular. Os poços de 1 a 5 correspondem ao fracionamento dos produtos de PCR obtidos em diferentes temperaturas de anelamento dos *primers*, respectivamente 60,5°C; 63,5°C; 66,8°C; 69,6°C e 71,9°C.

b) Amplificação de um fragmento da região 5' de *serpinb6* de rato, utilizando-se os *primers* 5ANTISPI3 e 3ANTISPI3 e cDNA preparado a partir de ST1 como molde em reação de PCR. Eletroforese em gel de agarose 1%. M corresponde ao marcador de peso molecular e AS corresponde ao produto de PCR.

5.4.2. Clonagem da porção codificante completa de *serpinb6* de rato em pENTR 2B

O fragmento referente à porção codificante completa de *serpinb6*, amplificado por PCR, conforme descrito no item anterior, foi clivado com as enzimas de restrição *Sall* e *NotI*, purificado a partir da solução e submetido à reação de ligação com o vetor pENTR 2B, preparado de acordo com o descrito em Materiais e Métodos.

Este fragmento foi clonado com sucesso em pENTR 2B e transferido por transposição para o vetor de expressão em mamíferos pDEST12.2.

Para verificar o sucesso da clonagem foi inicialmente utilizada a técnica de Rinji, PCR de colônia com os clones indicados como positivos por Rinji e extração de DNA plasmideal em pequena escala para diagnóstico por digestão de um dos clones indicados como positivos por Rinji e PCR de colônia **(Figura 25a, b, c)**.

O vetor pENTR 2B confere às bactérias resistência à kanamicina e o vetor pDEST12.2 confere resistência à ampicilina. Portanto, a transposição do inserto de *serpinb6* para pDEST12.2 foi inicialmente verificada pela capacidade das bactérias de crescerem em meio contendo ampicilina. A confirmação foi feita por restrição mostrando o sucesso da transposição (Figura não mostrada).

5.4.3. Clonagem da porção codificante completa de *serpinb6* de rato e do fragmento *antisense*, em pLPCX

A porção codificante completa de *serpinb6* e o fragmento *antisense* de 474pb incluindo uma parte da porção 5' da região codificante e uma parte da região 5' UTR, foram clonados com sucesso em pLPCX.

O fragmento *antisense* foi clonado a partir do produto de PCR purificado (**Figura 26a,b**), e a porção codificante completa foi subclonada a partir do clone de pENTR 2B (**Figura 25d**).

Figura 25:

a) Técnica de Rinji para visualização do conteúdo de ácidos nucleicos das bactérias transformadas com o produto da ligação de pENTR 2B e *serpinb6*. Fracionamento em gel de agarose 2%.

b) PCR de colônia de 9 clones provenientes da transformação de DH10B eletrocompetentes com o produto da ligação de pENTR 2B com o fragmento *sense* de *serpinb6* de rato. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR com os *primers* rSPI3F e rSPI3R.

c) Clivagem de um dos clones de pENTR 2B-*serpinb6* (positivo por Rinji e por PCR de colônia), com as enzimas de restrição *SalI* e *NotI*, que liberam o inserto do vetor. Eletroforese em gel de agarose 1%

d) Clivagem de um dos clones de pLPCX-*serpinb6* (positivo por Rinji e por PCR de colônia), com as enzimas de restrição *BglII* e *NotI*, que liberam o inserto do vetor. Eletroforese em gel de agarose 1%.

Figura 26:

a) PCR de colônia de 6 clones provenientes da transformação de DH10B eletrocompetentes com o produto da ligação de pLPCX com o fragmento *antisense* de *serpinb6* de rato. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR com os *primers* 5ANTISPI3 e 3ANTISPI3.

b) Clivagem de dois clones de pLPCX-serpinb6-AS (positivo por Rinji e por PCR de colônia), com as enzimas de restrição *Sa I* e *NotI*, que liberam o inserto do vetor. Eletroforese em gel de agarose 1%

5.4.4. Amplificação da porção codificante completa e de um fragmento *antisense* de PI (6) humano

O processo de obtenção da amostra de cDNA foi o mesmo descrito anteriormente para células ST1, porém foram utilizadas células T98G de glioma humano. Os testes de qualidade do cDNA produzido foram feitos com *primers* para amplificar GAPDH, Notch2 e MLH1 e os resultados mostraram que esta amostra de cDNA tinha qualidade adequada para ser utilizada como molde nas amplificações de PI(6) humano. A reação de PCR foi feita utilizando-se os *primers* hPI(6)FullF e hPI(6)FullR tendo sido possível amplificar com sucesso a porção codificante completa de PI(6) humano, contendo 1.130 pb. Um fragmento da região 5' da porção codificante deste gene, contendo cerca de 500 pb foi amplificado com sucesso, utilizando-se os *primers* hPI(6)ANTISENSE 1 e hPI(6)ANTISENSE 2. Estes fragmentos amplificados contêm, em suas extremidades, adaptadores para clivagem com as enzimas de restrição *SaII* e *NotI*, sítios que foram utilizados para as clonagens.

Figura 27: Amplificação da porção codificante completa de PI(6) humano, utilizando-se os *primers* hPI(6)FullF e hPI(6)FullR e cDNA preparado a partir de 4 linhagens celulares humanas diferentes como molde em reação de PCR (poços de 1 a 4); e amplificação de um fragmento da região 5' de PI(6) humano, utilizando-se os *primers* hPI(6)ANTISENSE 1 e hPI(6)ANTISENSE 2 e cDNA de 3 linhagens celulares humanas diferentes como molde em reação de PCR (poços de 5 a 7). Eletroforese em gel de agarose 1%. M corresponde ao marcador de peso molecular.

5.4.5. Clonagem da porção codificante completa e de um fragmento *antisense* de PI(6) humano

A porção codificante completa de PI(6) humano e o fragmento *antisense* de 500 pb incluindo uma parte da porção 5' da região codificante e uma parte da região 5' UTR, foram clonados com sucesso no vetor retroviral pLPCX.

Figura 28: Clivagem de pLPCX-PI(6) (canaleta 1) e pLPCX-PI(6)-AS (canaleta 2) com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Not*I, que liberam o fragmento do vetor, para confirmação da clonagem. Eletroforese em gel de agarose 1%, onde M representa o marcador de peso molecular.

5.4.6. Seqüenciamento da construção pDEST12.2-serpinb6

Após a confirmação da clonagem e transposição, a construção pDEST12.2-serpinb6 foi submetida a seqüenciamento automático. Foram encontradas 5 mutações nesta construção destinada à super-expressão de serpinb6 em células de mamífero (**Figura 29a**). Esta seqüência mutada foi traduzida com ferramentas específicas (www.expasy.ch) e submetida a alinhamento com a seqüência de referência para a proteína correspondente. Foi observado que estas 5 mutações geram a troca de 3 aminoácidos, sendo uma de forma conservada (de metionina para isoleucina) e duas de forma não conservada (de serina para glicina e de ácido glutâmico para glicina) (**Figura 29b**). Foi feita uma busca no mesmo banco de dados, por seqüências desta proteína de diversos organismos e o alinhamento mostrou que na região onde se encontram as duas trocas não conservadas, há grande diversidade de aminoácidos presentes e há seqüências depositadas de diferentes organismos, nas quais os aminoácidos que ocupam estas posições são idênticos ou semelhantes aos encontrados na seqüência mutada que amplificamos (**Figura 29c**).

Foram preparadas quatro novas populações de cDNA de ST1, provenientes de quatro extrações de RNA independentes. Este material foi utilizado como molde para amplificação da porção codificante completa de serpinb6 novamente e o produto das quatro reações de PCR foi seqüenciado. O seqüenciamento mostrou 100% de identidade com seqüências de referência e uma delas foi escolhida para clonagem em pENTR 2B novamente. Esta construção foi novamente seqüenciada, após confirmação da clonagem e o alinhamento mostrou 100% de identidade da seqüência clonada com a seqüência de referência.

Para diferenciar, a construção não mutada recebeu o nome pENTR 2B-serpinb6, e as mutadas foram chamadas de pENTR 2B-serpinb6-mut e pDEST12.2-serpinb6-mut.

5.4.7. Seqüenciamento das construções em pLPCX

Após a confirmação da clonagem, as construções pLPCX-serpinb6, pLPCX-serpinb6-mut, pLPCX-serpinb6-AS, pLPCX-hPI(6) e pLPCX-hPI(6)-AS foram submetidas à seqüenciamento automático. Foi verificado que os fragmentos *antisense* das construções pLPCX-serpinb6-AS e pLPCX-hPI(6)-AS, assim como a porção codificante completa de serpinb6 subclonada a partir de pENTR 2B-serpinb6 (não mutada) apresentam 100% de identidade com as seqüências de referência do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). O seqüenciamento de pLPCX-hPI(6) não foi completado, porém a região de 500pb seqüenciada não apresenta mutações. A construção pLPCX-serpinb6-mut contem as 5 mutações já descritas.

a)

>[gi|40018547/ref|NM_199085.1](#) [GU](#) Rattus norvegicus serine (or cysteine) proteinase inhibitor, (ovalbumin), member 6 (Serpinb6), mRNA
Length = 1387
Score = 2220 bits (1120), Expect = 0.0
Identities = 1135/1140 (99%)
Strand = Plus / Plus

b)

Score = 757 bits (1954), Expect = 0.0
Identities = 379/382 (99%), Positives = 380/382 (99%)

Query: 1	MDHLQEGNGIFALKLLKLTSEDSSNNIFLSPISISAALTMVFMGAKGMTASQMVQTLSDL 60
Sbjct: 1	MDHLQEGNGIFALKLLKLTSEDSSNNIFLSPISISAALTMVFMGAKGMTASQMVQTLSDL 60
Query: 61	KCSGNGGGDVHQGFQSLLAENVNKTGTQYLLKTANRLFGEKTCILASFKDACRKFYEAEM 120
Sbjct: 61	KCSGNGGGDVHQGFQSLLAENVNKTGTQYLLKTANRLFGEKTCILASFKDACRKFYEAEM 120
Query: 121	EELDFKGDTEQSRQRINTWVAKKTEDKIKELLAPGIVDPDTVLVLVNAIFYKGNWDKQFN 180
Sbjct: 121	EELDFKGDTEQSRQRINTWVAKKTEDKIKELLAPGIVDPDTVLVLVNAIFYKGNWDKQFN 180
Query: 181	KEHTREKPPFKVSKTEKPVQMMFMKSTFKMTYIGEIFTKILLIPYAGNELNMIIMLPDEH 240
Sbjct: 181	KEHTREKPPFKV SKTEKPVQMMFMKSTFKMTYIGEIFTKILLIPYAGNELNMIIMLPDEH 240
Query: 241	IELKTVEKELTYEKFIETRLDMLDEEEVEVFLPRFKLEENYDMKVVLGKLGMTDAFMEG 300
Sbjct: 241	IELKTVEKELTYEKFIETRLDMLDEEEVEVFLPRFKLEENYDMKVVLGKLGMTDAFMEG 300
Query: 301	RADFSGIASKQGLFLSKVIHKAFVEVNEEGTEAVAATGSTITRCLRFTPRFLADHPFLF 360
Sbjct: 301	RADFSGIASKQGLFLSKVIHKAFVEVNEEGTEAVAATGSTITRCLRFTPRFLADHPFLF 360
Query: 361	FIQHVKTGKILFCGRFSSPSTP 382
Sbjct: 361	FIQHVKTGKILFCGRFSSPSTP 382

c)

ORGANISMO		
consenso	consensus	136-DTRLVLVNAIFYFKGKWKTPFDPENTRE-EDFHVDETTTVKVPMMST
pDest12.2-serpinb6-mut	query	148-DTVLVLVNAIFYFKGNWDKQFNKEHTRE-KPFKVGKTGEKPVQMMFMK
humano	1ATH B	198-LTVLVLVNTIIFYKGLWKSFPENTRK-ELFYKADGESCSASMMYQE
rato	gi 2507388	190-KTSMVLVNYIIFYKGLWKVPFDPRTFQ-SEFYSGKRRPVKVPMMKLE
humano	gi 121110	165-LTRLVLVNAVYFKGLWKSFPENTTKK-RTFVAADGKSYQVPMMLAQL
rato	gi 121111	165-LTKLVLVNAVYFKGLWKSFPENTTKK-RTFVAGDGKSYQVPMMLAQL
cowpox virus	gi 1174419	125-NTRMTVVS AVHF KAMWKYPFSKHLTYT-DKFIYSKNIVTSVDMMVST
myxoma virus	gi 134820	128-DTKMLLLSSVRMKTSWRHVFDPSFTTD-QPFYSGN-VTYKVRMMNKI
vaccinia virus	gi 134823	123-NTRMTVVS AVHF KAMWKYPFSKHLTYT-DKFIYSKNIVTSVDMMVGT

Figura 29: a) Alinhamento da sequência de nucleotídeos obtida para pDEST12.2-serpinb6-mut com a sequência referência para serpinb6 do *GenBank* (blastn).

b) alinhamento da sequência de aminoácidos de serpinb6 do *GenBank* com a sequência obtida no sequenciamento de pDEST12.2-serpinb6, traduzida (blast two sequences)

c) alinhamento da sequência consenso de serpinb6 com a sequência de diversos organismos, na região onde foram encontradas as mutações.

5.5. Geração de populações celulares recombinantes para o estudo dos efeitos de serpinb6

5.5.1. Transfecção com construção plasmideal

5.5.1.1. Transfecção de células C6, ST1 e T98G com a construção pDEST12.2-serpinb6-mut e pDEST12.2-neg

Antes da transfecção, foi feito um teste para determinação da concentração adequada de antibióticos a serem utilizados na seleção dos clones. Para tanto, as células foram plaqueadas, tripsinizadas e diluídas, simulando as condições da transfecção e tratadas com diferentes concentrações de diferentes antibióticos durante duas semanas. Os resultados indicaram que a melhor condição para seleção dos clones de C6, ST1 e T98G era a utilização de 350µg/mL de higromicina (marcador de resistência presente no vetor pX343 co-transfectado) e 500µg/mL de geneticina (marcador de resistência presente na própria construção).

Após a transfecção e seleção com os antibióticos, foi possível isolar diversos clones transfectantes de T98G e alguns de C6, porém houve grande dificuldade para o isolamento de clones de ST1, pois os poucos clones gerados apresentavam velocidade de crescimento muito baixa.

Os clones gerados nesta transfecção foram analisados por *Real Time PCR*, para verificar se super-expressavam serpinb6. Foi possível obter populações mistas de T98G super-expressando serpinb6 quando comparados com o vetor vazio pDEST12.2-neg (**Figura 30**), entretanto não foi possível isolar clones de ST1 e os poucos clones isolados de C6 não super-expressam o gene de interesse (**Figura 31**). Análise estatística confirmou que a super-expressão de serpinb6 nas populações de T98G geradas a partir de pDEST12.2-serpinb6-mut é significativa ($p < 0,05$).

Figura 30: Verificação da expressão de serpinb6 nos transfectantes de T98G, por *Real Time PCR*.

Figura 31: Verificação da expressão de serpinb6 nos transfectantes de C6 por *Real Time PCR*.

5.5.2. Infecção com retrovírus recombinantes

As construções obtidas para as seqüências de rato (pLPCX-serpinb6, pLPCX-serpinb6-mut, pLPCX-serpinb6-AS), assim como o controle negativo pLPCX-neg e o controle para verificação da eficiência de transfecção, infecção e seleção pLPCX-EGFP (**Figura 32**), foram utilizados para gerar os retrovírus correspondentes, por transfecção das células ϕ nx-ampho.

A titulação dos retrovírus gerados foi feita em células NIH-3T3, por contagem direta do número de colônias expressando EGFP, observadas em microscópio de fluorescência, e também pelo número de colônias resistentes ao tratamento com puromicina por 8 dias. Neste ensaio, foi possível verificar que o título obtido para os retrovírus gerados foi da ordem de 10^5 CFU/mL, antes da concentração.

Como o método utilizado para concentração das partículas virais por centrifugação aumenta o título teoricamente em duas ordens de grandeza, consideramos que a infecção de ST1 foi feita com título da ordem de 10^7 CFU/mL.

Para aumentar a porcentagem de células infectadas, foram feitas duas infecções sucessivas da mesma população, seguida de seleção com puromicina na concentração $1\mu\text{g/mL}$. Esta concentração de puromicina foi determinada em um ensaio de sensibilidade, utilizando-se diferentes concentrações deste antibiótico para tratar as células ST1. A concentração utilizada foi aquela capaz de matar 80% das células não infectadas.

As populações geradas após dupla infecção e seleção com puromicina foram expandidas, congeladas e utilizadas para a realização de ensaios funcionais e verificação do nível de expressão de serpinb6 por *Real Time PCR*.

Foi possível encontrar uma população de células ST1, gerada a partir da construção pLPCX-serpinb6, na qual o nível de expressão de serpinb6 é cerca de 6 vezes mais alto do que no controle

parental, (**Figura 33**). Entretanto, por *Real Time PCR* não foi possível verificar diferenças significativas de expressão de serpinb6 nas populações geradas a partir das construções pLPCX-serpinb6-mut e pLPCX-serpinb6-AS. A indução de serpinb6 observada na população pLPCX-serpinb6 é estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 32: Verificação da eficiência de transfecção de ϕ nx-ampho com pLPCX-EGFP (A e B), infecção dupla de ST1 com o retrovírus correspondente (C e D) e seleção de ST1 com puromicina (E e F). A, C e E foram fotografadas sob luz visível. B, D e F foram fotografadas sob luz fluorescente. Aumento de 100x.

Figura 33: Verificação da expressão de serpinb6 nas populações de ST1 geradas por infecção dupla com retrovírus e seleção com puromicina, por *Real Time PCR*.

5.6. Análise do fenótipo das populações celulares geradas por transfecção e infecção

As populações celulares geradas por transfecção e as populações geradas por infecção, nas quais foi possível confirmar a super-expressão de serpinb6 por *Real Time PCR*, e os respectivos controles, foram utilizados em ensaios funcionais, para análise de possíveis alterações de fenótipo induzidas pela super-expressão deste gene. Os ensaios funcionais escolhidos para análise foram: curvas de crescimento em substrato sólido, capacidade de crescimento em suspensão de agarose, incorporação de timidina radioativa e ensaio de viabilidade celular por metabolização de MTT.

5.6.1. Observação da morfologia das populações geradas

O efeito de ATRA sobre a morfologia das células ST1 é bastante evidente, especialmente após 48h de tratamento. Ocorre um alongamento e achatamento celular e uma nítida reorganização das células que passam a se apresentar na forma de feixes orientados. Na **Figura 34** pode-se ver a morfologia das células ST1 após dupla infecção com os retrovírus recombinantes e seleção com puromicina. Nas células infectadas com os retrovírus provenientes da construção pLPCX-serpinb6, foi possível observar alteração morfológica semelhante à induzida por ATRA nas células parentais. As fotografias correspondem a campos representativos da placa utilizada no ensaio de curva de crescimento em substrato sólido, partindo portanto do mesmo número de células.

Para as células T98G não foi possível observar diferença significativa de morfologia. Apenas pode-se sugerir que há discreto achatamento das células tratadas com ATRA por 48h (**Figura 35**).

Figura 34: Morfologia das células ST1 imediatamente antes da coleta do ponto de 72h da curva de crescimento em substrato sólido. Os campos são representativos de toda a placa. (A – ST1 Parental; B – ST1 infectada com o retrovírus selvagem pLPCX-neg; C – ST1 infectada com o retrovírus recombinante pLPCX-serpinb6; D – ST1 infectada com o retrovírus recombinante pLPCX-serpinb6-AS; E – ST1 Parental tratada com 10^{-5} M ATRA por 72h). Aumento de 100x.

Figura 35: Morfologia das células T98G imediatamente antes da coleta do ponto de 48h da curva de crescimento em substrato sólido. Os campos são representativos de toda a placa. (A – T98G Parental; B – T98G transfectada com a construção selvagem pDEST12.2-neg; C – T98G transfectada com a construção recombinante pDEST12.2-serpinb6-mut; D – T98G Parental tratada com 10-5M ATRA por 72h). Aumento de 100x.

5.6.2. Curvas de crescimento em substrato sólido

Na determinação da curva de crescimento em substrato sólido, não foi possível observar diferença significativa no tempo de dobramento ou na densidade de saturação quando se compara as populações de interesse com os devidos controles. A única diferença observada nesta análise foi para a linhagem ST1 parental tratada com ATRA, que apresenta maior tempo de dobramento e menor densidade de saturação, os quais são estatisticamente significativos quando comparados com os controles ($p < 0,05$) (**Figura 36**). Para a linhagem T98G, nem mesmo o tratamento com ATRA alterou parâmetros da curva de crescimento de forma estatisticamente significativa. É possível afirmar apenas que parece haver uma tendência de ATRA induzir diminuição da densidade de saturação destas células (**Figura 37**). Este ensaio foi realizado duas vezes com populações distintas em duplicata.

Linhagem celular	Tempo de dobramento (h)	Densidade de saturação (nº de céls x 10 ⁴ /cm ²)
ST1 Parental	13	33,5
ST1 10 ⁻⁵ M ATRA	24	6,7
PLPCX-neg	15	40,5
pLPCX-serpinb6	14	33,5
PLPCX-serpinb6-AS	15	39,8

Figura 36: Curva de crescimento de células ST1 em substrato sólido nas condições especificadas na tabela ao lado do gráfico, e tabela mostrando o tempo de dobramento e densidade de saturação calculados. Os parâmetros da tabela foram calculados com base na média dos pontos da curva.

Linhagem celular	Tempo de dobramento (h)	Densidade de saturação (nº de céls x 10 ⁵ /cm ²)
T98G Parental	32	4,3
T98G 10 ⁻⁵ M ATRA	31,3	3,1
PDest12.2-neg	28	5,2
Pdest12.2-serpinb6-mut	33	5,5

Figura 37: Curva de crescimento de T98G em substrato sólido nas condições especificadas na tabela ao lado do gráfico, e tabela mostrando o tempo de dobramento e densidade de saturação calculados. Os parâmetros da tabela foram calculados com base na média dos pontos da curva.

5.6.3. Crescimento em suspensão de agarose

No ensaio para verificar a eficiência de plaqueamento em suspensão de agarose, o resultado foi analisado com base no número e tamanho das colônias formadas. Para ST1 foram contados quatro campos independentes de dois experimentos independentes feitos em duplicata (total de quatro placas por condição). Para T98G foram contados quatro campos independentes de um experimento. Para aferir o tamanho das colônias foi utilizada uma objetiva contendo campo quadriculado. Colônias menores que um quadrado deste campo foram chamadas de pequenas (P), colônias do tamanho do quadrado foram chamadas de médias (M) e as maiores que um quadrado foram classificadas como grandes (G). Foi possível observar algumas diferenças de comportamento entre as populações estudadas. No caso das células ST1, a população gerada pela infecção com o retrovírus correspondente à construção pLPCX-serpinb6 mostrou maior habilidade de crescimento em suspensão, formando maior número de colônias e também colônias de maior tamanho. Estas diferenças entre esta população e a população infectada com o retrovírus selvagem pLPCX-neg foram consideradas estatisticamente significativas pelas análises feitas. Houve também aumento do número de colônias formadas pela população infectada com o retrovírus da construção *antisense* pLPCX-serpinb6-AS, entretanto a maior parte das colônias formadas por esta população foi de tamanho pequeno (**Figura 38a,b**).

Para as células T98G, foi possível observar diminuição da capacidade de formação de colônias em meio semi-sólido, porém houve problemas técnicos com um dos experimentos e o gráfico representa apenas a média de uma única análise em duplicata, sendo impossível fazer observações estatisticamente significativas (**Figuras 39a,b**).

Figura 38: a) Gráfico comparando a capacidade de crescimento em suspensão das populações de ST1 geradas, por número e tamanho de colônias (P corresponde à colônias pequenas, M médias, G grandes e T ao número total de colônias formadas).

Figura 38: b) Morfologia das colônias formadas, representativas de todo o campo (A – ST1 Parental; B – pLPCX-neg; C – pLPCX-serpinb6, D – pLPCX-serpinb6-AS; E – ST1 Parental tratada com 10^{-5} M ATRA).

Figura 39: a) Gráfico comparando a capacidade de crescimento em suspensão das populações de T98G geradas, por número e tamanho de colônias. (P corresponde à colônias pequenas, M médias, G grandes e T ao número total de colônias formadas).

Figura 39: b) Morfologia das colônias formadas, representativas de todo o campo (A – T98G Parental; B – pDEST12.2-neg; C – pDEST12.2-serpinb6-mut, D – T98G Parental tratada com 10⁻⁵M ATRA).

5.6.4. Ensaio de incorporação de timidina radioativa

Para confirmar os resultados das curvas de crescimento em substrato sólido, foi realizado o ensaio de incorporação de timidina radioativa, com as populações de ST1 e T98G geradas. Assim como no resultado das curvas de crescimento, este experimento mostrou que não há diferença significativa na taxa de crescimento entre as populações geradas para as duas linhagens, porém todas sofrem diminuição da taxa de crescimento quando tratadas com 10^{-5} M ATRA, no caso por 24h (**Figuras 40 e 41**).

Figura 40: Ensaio de incorporação de timidina radioativa pelas populações de ST1 especificadas no gráfico.

Figura 41: Ensaio de incorporação de timidina radioativa pelas populações de T98G especificadas no gráfico.

5.6.5. Ensaio de MTT

Ensaio de metabolização de MTT também foi realizado, mostrando que a diminuição da taxa de crescimento de ST1 e T98G após tratamento com ATRA não é devido à morte celular, pois estas continuam com a mesma taxa de metabolismo (**Figura 42 e 43**)

Figura 42: Ensaio de MTT para as populações de ST1 especificadas no gráfico.

Figura 43: Ensaio de MTT para as populações de T98G especificadas no gráfico.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise proteômica do efeito anti-tumoral de ATRA

6.1.1. Implantação e padronização da metodologia proteômica de 2D-PAGE e MALDI-TOF

A metodologia de eletroferese bidimensional foi escolhida para utilização neste estudo pelas vantagens que apresenta neste tipo de análise comparativa. Esta técnica foi implantada no laboratório especificamente para o desenvolvimento deste projeto e de outro projeto paralelo (do Doutorando Marcos Demasi), para complementar os dados já obtidos por nosso grupo anteriormente, utilizando diferentes metodologias de comparação dos níveis de RNA mensageiro nos modelos celulares de interesse [66, 67, 116].

Inicialmente, o objetivo era encontrar o maior número possível de proteínas com variação de abundância modulada por ATRA. Para tanto, optamos por implantar a metodologia de 2D-PAGE e padronizá-la, gerando perfis de extrato celular total, marcados metabolicamente com metionina radioativa, o método de detecção que apresenta a maior sensibilidade possível.

Após algumas tentativas, foi feito o acerto dos parâmetros a serem utilizados, como: condições de tratamento das células e marcação com metionina radioativa, composição da solução de lise, método ideal para normalização da quantidade de proteínas, tempos de corrida e voltagem aplicada, método de secagem dos géis obtidos, período de tempo de exposição à tela de európio do *Storm PhosphorImager* e diversos outros detalhes do processo.

Porém, ao gerarmos os primeiros perfis bidimensionais com sucesso, foi possível perceber que as próximas etapas, especificamente a análise de imagem e a análise dos *spots* de interesse por MALDI-TOF estariam comprometidas pelo tipo de amostra e detecção utilizados. A utilização de extrato celular total e

a marcação radioativa não representam os métodos mais adequados para este enfoque proteômico.

O método de detecção por emissão radioativa não se mostrou adequado, pois após a análise de imagem, se torna difícil encontrar no gel os *spots* de interesse para excisão e análise, uma vez que a imagem gerada é virtual, além do que, muitas vezes não há massa suficiente de proteína no *spot* de interesse.

Foi testado então o método de coloração dos mesmos perfis por prata, após exposição à tela de európio do *Storm PhosphorImager*. Entretanto, a imagem obtida do mesmo perfil pelos dois métodos é bastante diferente, por registrar duas situações distintas. A emissão radioativa mede *turnover* protéico, enquanto a coloração por prata mostra as proteínas presentes em um dado momento, por abundância de massa. Proteínas muito abundantes, porém com baixo *turnover*, ou seja, muito estáveis, não são detectadas no perfil radioativo e proteínas de baixa abundância, mas pouco estáveis, dificilmente são detectadas no perfil corado por prata. De um modo geral, o número de *spots* presentes em um perfil corado por prata corresponde a cerca de $\frac{1}{4}$ do número de *spots* presentes no mesmo perfil detectado radioativamente, tornando quase impossível analisar a imagem de um perfil e excisar os *spots* no outro. Esta conclusão nos fez abandonar a marcação metabólica e trabalhar somente com perfis corados por prata, decisão também sustentada pelo fato do limite inferior de sensibilidade do espectrômetro ser da mesma ordem de grandeza do limite de sensibilidade da coloração por prata.

Outro problema encontrado foi a complexidade da amostra. A utilização de extrato celular total de células de mamífero, especialmente células complexas como aquelas do SNC, gera perfis muito complexos, com grande número de *spots*, sendo este um fator limitante para a adequada análise de imagem, um processo ainda bastante manual, apesar do grande número de programas de

computador disponíveis. Optou-se então pelo fracionamento subcelular.

Os géis utilizados inicialmente foram comprados prontos, na espessura de 0,5mm, para garantir melhor resolução e reprodutibilidade e também porque estes são os géis mais adequados para o equipamento de eletroforese horizontal (Multiphor II – Amersham Biosciences) que adquirimos. Este sistema horizontal permite a corrida de apenas um gel por vez, tornando a segunda dimensão a etapa lenta do processo, uma vez que as isoeletrofocalizações são geralmente feitas em triplicata. Outra limitação deste sistema, que utiliza géis extremamente delgados, foi observada quando surgiu a necessidade de gerar perfis com maior massa de proteínas, para melhorar a eficiência de identificação dos spots de interesse por espectrometria de massa.

Estes problemas foram solucionados com a troca do sistema de segunda dimensão para um sistema vertical (Ettan DALT Six – Amersham Biosciences), que permite a corrida de seis géis de 1,5mm de espessura em paralelo, garantindo melhor reprodutibilidade de corrida e maior capacidade de carregamento de proteínas, podendo-se utilizar amostras concentradas, da ordem de 1mg. O método de coloração por prata também foi substituído pelo método de coloração com Coomassie Blue coloidal, o qual tem praticamente a mesma sensibilidade que esta, porém descora mais facilmente e interfere menos na geração dos espectros de massa.

Embora tenham sido feitas estas alterações de sistema para os últimos géis preparativos gerados, todos os géis analíticos foram preparados com o equipamento horizontal de 0,5mm e corados por prata.

Uma vez padronizadas as condições para obtenção dos perfis bidimensionais, foi necessário padronizar o processo de excisão dos spots e identificação por espectrometria de massa.

Na **Figura 8** está representado um espectro de baixa qualidade, obtido para o *spot* 2. Com o auxílio de informações adicionais sobre este *spot*, foi possível inferir sua identidade como sendo possivelmente a proteína c-Fos, porém se não dispuséssemos de outras informações a respeito deste *spot*, a identificação não seria possível.

O processo de identificação do *spot* 2 foi repetido quatro vezes, partindo-se de géis independentes, mas nunca foi possível obter um bom espectro. Os espectros obtidos foram sempre semelhantes ao mostrado na **Figura 8**, onde pode-se ver um grande número de picos, o que sugere mistura de proteínas no mesmo *spot*. No entanto, ao fazer análise dos dados do espectro, utilizando os bancos de dados do *Swiss-Prot*, a proteína que melhor se enquadrou com as características do *spot*, como peso molecular, ponto isoelétrico, organismo e fração subcelular estudada, foi a proteína c-Fos, um clássico indutor de proliferação que atua em conjunto com a proteína c-jun, no chamado complexo AP-1 [145].

Diversos trabalhos já mostraram a capacidade de ácido retinóico inibir a expressão de c-fos, em diversos sistemas [146]. Com base nestas informações, poderíamos inferir que o *spot* 2 corresponde a c-Fos, porém este dado ainda deve ser confirmado através da obtenção de melhores espectros ou utilização de outra tecnologias.

Optou-se por adicionar a análise do *spot* 2, possivelmente correspondente a c-Fos neste trabalho, apesar de não ser possível afirmar sua identidade, apenas para exemplificar um dos problemas que geralmente são encontrados por quem trabalha com este enfoque de *peptide mass fingerprinting*. Como neste exemplo, nem sempre o resultado da espectrometria de massa é direto e conclusivo, sendo necessário encontrar as condições ideais para obter espectros que permitam identificação inequívoca. De início, tivemos problemas semelhantes a este para a identificação de todos

os *spots*, o que foi solucionado utilizando-se géis mais carregados (150µg de proteínas), e *zip tips* para dessalinização da mistura de fragmento trípticos. No caso do *spot* 6, foram mostrados os espectros da amostra bruta e da amostra dessalinizada com *zip tips* (amostra 6z), evidenciando que ambas foram identificadas como sendo a mesma proteína, porém os fragmentos trípticos encontrados foram diferentes, complementando e dando maior confiabilidade ao resultado.

Em alguns casos, entretanto, nem mesmo a padronização do preparo das amostras para análise permitiu a identificação dos *spots*, como é o caso dos *spots* 1 e 10. O *spot* 1 corresponde ao *spot* mais abundante de nosso trabalho, o qual é evidentemente regulado por ATRA e também por GC (trabalho desenvolvido em paralelo por outro doutorando do laboratório), porém apesar de inúmeras tentativas, nunca foi possível obter pico algum no espectro referente a este *spot*. Uma explicação para este resultado é a possibilidade de se tratar de uma proteína pobre em aminoácidos lisina e arginina (sítios de reconhecimento e clivagem por tripsina), o que geraria fragmentos trípticos muito grandes, os quais não são eficientemente extraídos do gel após a digestão. Este é um dos motivos pelos quais algumas proteínas não são identificáveis pela metodologia aplicada.

Após a padronização de todas as condições, foi possível identificar com sucesso seis dos *spots* de interesse, conforme será discutido abaixo.

6.1.2. Análise dos resultados obtidos por 2D-PAGE e MALDI-TOF no estudo do efeito de ATRA sobre células ST1

Após o fracionamento celular, foi possível obter com sucesso perfis bidimensionais de extratos citoplasmáticos e nucleares de ST1. Devido ao interesse específico do nosso grupo em proteínas

envolvidas com proliferação celular, os perfis nucleares foram escolhidos para as etapas seguintes de análises.

Através de análise de imagem, utilizando o programa 2D Elite, foi possível encontrar para os perfis nucleares de ST1, dezenas de *spots* cuja abundância varia potencialmente sob efeito de ATRA. Entretanto, para a maior parte destes *spots*, a variação de intensidade não pode ser detectada visualmente, sendo a única referência o valor de volume corrigido, fornecido pelo programa de análise. Alguns destes *spots* apresentam diferença de abundância de apenas 1,1 vez entre controle e tratado tendo sido excluídos da análise.

Decidiu-se identificar por espectrometria de massa apenas os *spots* cuja diferença de abundância relativa entre controle e tratado fosse detectada pelo programa de análise, mas que pudesse ser confirmada visualmente, como é o caso dos nove *spots* da **Figura 7**.

Dentre os nove *spots* selecionados para identificação, seis foram identificados com sucesso, com alto grau de confiança e para um houve apenas sugestão de identidade, (*spot* 2 – c-Fos), tendo sido descrito no item anterior, apenas para exemplificar a dificuldade de obtenção de espectros de qualidade.

Os seis *spots* identificados correspondem às proteínas: SCGF, TCTP, actina, GRP78, tubulina e Hsc70. O fato de os estudos terem sido realizados com extratos enriquecidos para proteínas nucleares não exclui a identificação de proteínas citoplasmáticas, uma vez que os extratos são enriquecidos e não exclusivos de proteínas nucleares. Muitas vezes também, uma proteína é descrita inicialmente como tendo localização extra-nuclear, porém pode em algumas situações ser encontrada no núcleo.

A proteína SCGF foi identificada, em nosso modelo celular, como sendo significativamente inibida pelo tratamento com ATRA. Esta proteína corresponde a um fator de crescimento tendo sido

descrita em células do sistema hematopoiético, onde atua estimulando a proliferação e diferenciação de células precursoras de diversas linhagens, incluindo eritrócitos, linfócitos, granulócitos e macrófagos. Neste sistema, atua de forma sinérgica com outras citocinas, incluindo IL-3, G-CSF e GM-CSF [147, 148].

Trata-se de uma proteína relativamente nova, cuja expressão em tecido cerebral ainda não foi descrita, porém os resultados estão de acordo com o esperado, quando se considera que se trata de um fator pró-proliferação, ao menos nas células onde já foi descrito, sendo inibido por ação de ATRA, o agente que induz a parada de crescimento no modelo estudado.

Alguns trabalhos mostram a relação entre células precursoras do sistema hematopoiético e células da glia, mais especificamente microglia, descrevendo a capacidade de precursores hematopoiéticos sofrerem transdiferenciação, convertendo-se em células da microglia, o que seria uma explicação para a expressão, no cérebro, de uma proteína classicamente de células da medula, caso esta expressão venha a ser verificada [149]. A confirmação do efeito pró-proliferação deste fator sobre células gliais, o tornaria um alvo interessante para os estudos de glioma e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Outro efeito do tratamento de células ST1 com ATRA foi a significativa inibição de uma proteína tumoral chamada TCTP, também conhecida como fator liberador de histamina, fortalina ou p23. Esta proteína já foi descrita em diversos sistemas como sendo reprimida em processos de reversão fenotípica tumoral-normal, corroborando os dados obtidos em nosso laboratório [150].

Um trabalho recente de Proteoma, comparou o epitélio ovariano superficial de pacientes com histórico familiar de câncer de ovário e/ou mama, portando mutação do gene supressor de tumor BRCA-1, com o epitélio ovariano de pacientes sem histórico familiar e apresentando BRCA-1 normal, por eletroforese bidimensional

acoplada à espectrometria de massa. Este estudo encontrou alterações de expressão em TCTP e cadeia beta de tubulina, semelhantes às encontradas em células ST1 tratadas com ATRA, se considerarmos os estados de ST1 tratada com ATRA e pacientes com BRCA-1 normal como padrões mais próximos da normalidade e ST1 não tratada e pacientes com BRCA-1 mutado como padrões mais próximos da malignidade. Assim como ocorre após o tratamento de células ST1 com ATRA, os pacientes sem mutação de BRCA-1 possuem níveis mais baixos de tubulina beta e de TCTP. Foram descritas, também, alterações em genes relacionados com actina, outra proteína induzida por ATRA em nosso sistema [151].

Outro trabalho de Proteoma, compara a linhagem de câncer colo-retal Caco-2 ao longo da diferenciação induzida por confluência, mostrando que ao longo da diferenciação, conforme estas células perdem o fenótipo tumoral, também passam a expressar menos TCTP, mais uma vez reproduzindo, em outro sistema, o mesmo efeito induzido por ATRA em células ST1 [152].

Não há relatos na literatura sobre o efeito de ATRA inibindo a expressão de TCTP, entretanto os dados apresentados reforçam o papel anti-tumoral deste retinóide.

Inicialmente descrita como uma proteína relacionada à proliferação celular, TCTP também está envolvida com ligação à cálcio, regulação de apoptose e estabilização de microtubulos, co-localizando com tubulina nas linhagens celulares estudadas [153, 154].

Um estudo de interação através da metodologia de duplo híbrido em levedura mostrou que TCTP interage com EF-1 delta, envolvido em síntese protéica. A interação com este fator, que também já foi associado à malignidade em trabalhos anteriores, foi comprovada por ensaio de imunoprecipitação [155]

Apesar de geralmente serem utilizadas como controle interno [156], duas proteínas de citoesqueleto, actina e tubulina beta foram

encontradas como sendo reguladas por ATRA nas células ST1. Actina teve sua abundância aumentada pelo tratamento e tubulina foi reprimida. Diversos trabalhos mostram regulação nos níveis de expressão destas duas proteínas quando se comparam células tumorais com células normais.

Um estudo de imuno-histoquímica, utilizando anticorpos contra tubulina beta, mostrou que sua abundância é significativamente maior em células mioepiteliais tumorais quando se compara com células mioepiteliais normais [157].

É sabido que não apenas ocorrem diferenças no nível de expressão de proteínas de citoesqueleto durante processos de apoptose, proliferação, diferenciação e reversão tumoral-normal, mas também há redistribuição e reorganização destas proteínas no interior das células [158-160]. Pelo fato de ST1 sofrer intensa alteração morfológica após o tratamento com ATRA, é esperado que proteínas de citoesqueleto sejam moduladas.

Apesar do mecanismo de ação do alcalóide opiáceo noscapina, não ser bem compreendido, sabe-se que se liga à tubulina, alterando a dinâmica dos microtúbulos *in vitro* e *in vivo*, sendo capaz de inibir crescimento das células C6 de glioma de rato em cultura, ou quando esterotacticamente implantadas no cérebro de camundongos *nude* [161].

Um estudo proteômico comparando glioma com tecido cerebral normal, identificou um grupo de proteínas relacionadas com citoesqueleto como sendo diferencialmente expressas, sugerindo o envolvimento da modulação do citoesqueleto com a tumorigênese nos gliomas [115].

O *spot 6* foi identificado como correspondendo a GRP78, uma proteína do tipo chaperona, de localização no retículo endoplasmático. Esta proteína é induzida em condições de estresse celular, provocado por perfusão inadequada em tumores sólidos. A perfusão inadequada resulta em microambientes de hipóxia e falta

de nutrientes, fazendo com que as células sofram inibição de crescimento e tenham indução de expressão de GRP78 [162]. Trata-se de um marcador de estresse de retículo endoplasmático. Astrócitos mantidos em acidose (pH 6,0) por 3h já expressam níveis mais elevados de GRP78. [163]. Seu papel como fator anti-apoptótico pode ser inferido pela capacidade de bloquear caspase-7 e caspase-12, protegendo as células da morte induzida por estresse em retículo endoplasmático [164].

A indução desta proteína já foi descrita nas células C6, quando são adicionadas concentrações tóxicas de chumbo e mercúrio ao meio de cultura [165, 166], portanto, indicando o efeito citoprotetor de ATRA. São descritos casos em que o tratamento com ATRA leva diversas linhagens celulares à apoptose, mesmo em concentrações tão baixas quanto 100nM [87]. Dados não publicados do nosso laboratório mostram que o tratamento de células ST1 com 10^{-5} M (10 μ m) ATRA por 10h, nas mesmas condições utilizadas neste trabalho, não induz apoptose, o que foi verificado pelo ensaio de TUNEL [116]. A indução de GRP78 em ST1 pode ser o mecanismo molecular, ao menos parcial, através do qual estas células são protegidas da morte.

O único trabalho que relaciona a expressão de GRP78 com retinóides, foi conduzido tratando condrócitos fetais bovinos por 5 dias com ácido retinóico, observando-se que o tratamento induz diferenciação e inibe o nível de expressão de GRP78 em 75% [167]. Talvez a resposta apoptótica de diferentes linhagens ao ácido retinóico, seja dependente da modulação desta chaperona.

Além das proteínas de citoesqueleto actina e tubulina e da chaperona GRP78, uma outra proteína de resposta a estresse celular, Hsc70, foi induzida pelo tratamento de células ST1 com ATRA.

Coincidentemente, um trabalho mostra a comparação do perfil de fosfoproteínas (2D-PAGE seguido de *Western blot* com anticorpo

anti-fosfotirosina e espectrometria de massa) de tecido mamário tumoral com tecido mamário normal e conclui que as fosfoproteínas específicas de tecido tumoral são mais comumente as de citoequeleto (actina, tubulina e vimentina) e as chaperonas (Hsp70, Hsc70, and GRP75) [168]. Este trabalho mostra o envolvimento de um grupo de proteínas que foram identificadas como moduladas por ATRA em células ST1, sendo moduladas também em tumores de mama. A partir deste trabalho pode-se notar que não apenas o nível de expressão de proteínas de citoesqueleto e chaperonas é modulado quando se compara populações celulares normais e tumorais, mas também seu estado de fosforilação. A identificação de proteínas de citoequeleto e proteínas de resposta a estresse celular como as fosfoproteínas mais abundantes em tumores de mama, implica que estas moléculas são os alvos primários de fármacos anti-tumorais cujo mecanismo de ação é inibir proteínas contendo fosfotirosina, por razões estequiométricas.

As proteínas HSP70 e Hsc70 são capazes de se ligar especificamente à proteínas mutadas no sistema nervoso central, marcando-as para ubiquitinação e degradação [169].

Situações de estresse celular, como o choque térmico, por exemplo levam à alterações dinâmicas da distribuição núcleo-citoplasmática de uma variedade de proteínas, sendo característico o aumento da importação de Hsc70 pelo núcleo nestas situações [170].

Um estudo proteômico comparativo das linhagens de carcinoma de célula escamosa cervical A431 e a variante resistente ao tratamento com cisplatina A431/Pt mostrou que Hsc70 é mais expressa nas células resistentes [171], sugerindo seu papel de fator de resistência a determinados fármacos, o que também é observado no tratamento de alguns parasitas [172].

Proteínas de choque térmico da família de HSP70 têm efeito citoprotetor em condições de anóxia e hipóxia, impedindo que as

células entrem em apoptose [173]. Logo, a indução de GRP78 e Hsc70 em células ST1 após o tratamento com ATRA, parece ter a função conjunta de proteção contra morte celular programada, fazendo com que este fármaco induza parada de crescimento mas não apoptose.

De um modo geral, pode-se afirmar que as proteínas encontradas como sendo moduladas por ATRA em ST1 são fatores diretamente ligados à proliferação (SCGF, c-Fos, e TCTP), proteínas de citoesqueleto (actina, tubulina) e proteínas de resposta a estresse e fatores anti-apoptose (GRP78 e Hsc70), classes de proteínas classicamente envolvidas com o controle a proliferação celular, conforme era esperado.

6.1.3. Análise dos perfis bidimensionais de T98G

No caso das células T98G, foi possível obter perfis de extratos nucleares e extratos totais. Entretanto, não foi possível encontrar *spot* algum de interesse para identificação, pois os perfis obtidos para as células tratadas são praticamente idênticos aos perfis obtidos para as células controle.

É possível que as diferenças possivelmente existentes correspondam a proteínas pouco abundantes, ou proteínas de alto peso molecular, ou muito básicas, para as quais a metodologia de eletroforese bidimensional não é adequada. Para estes casos, metodologias que não utilizam gel na fase de separação, substituindo esta por cromatografia ou análise em espectrometria de massa direta, seriam mais adequadas.

6.2. Análise da expressão de serpinb6 em linhagens celulares de glioma tratadas com ATRA

A expressão de serpinb6, bem como do homólogo humano PI(6) foi testada em linhagens celulares de glioma, em diferentes

períodos de tempo de tratamento com 10^{-5} M ATRA, através de *Northern blot* e *Real Time PCR*.

Foi possível verificar que ATRA induz a expressão de serpinb6 em células ST1, conforme já havia sido descrito no laboratório [116] de modo tempo-dependente atuando da mesma forma em C6, o que já era esperado, uma vez que a variante ST1 é derivada da linhagem C6.

As linhagens derivadas de dois gliomas humanos independentes T98G e A172 também foram testadas. T98G é uma linhagem que responde ao tratamento com ATRA, sofrendo inibição de crescimento e A172 é resistente ao tratamento. Observou-se por *Real Time PCR* que ATRA não altera de modo significativo a expressão de hPI(6) nestas duas linhagens. Esta observação evidencia a complexidade dos estudos dos retinóides e também dos gliomas. Os retinóides ativam vias diferentes em células diferentes, dependendo dos receptores e moléculas ligantes presentes. A enorme variabilidade molecular dos gliomas, que acaba gerando toda a problemática de diagnóstico, prognóstico e terapia uniformes, conforme descrito na Introdução, também está exemplificada neste trabalho em que diferentes linhagens de glioma respondem de forma diferente ao tratamento com uma mesma molécula. As células C6 e ST1 são responsivas ao tratamento e sofrem indução de serpinb6, enquanto T98G e A172 não apresentam alterações nos níveis de serpinb6 quando tratadas com ATRA; entretanto T98G responde ao tratamento sofrendo inibição de crescimento e A172 é resistente.

Este padrão particular de resposta dos gliomas frente a diferentes fármacos e mesmo de ATRA em diferentes linhagens, é um importante indício da necessidade de desenvolvimento da Farmacogenômica, que propõe a utilização de fármacos personalizados para cada paciente, um *status* ainda distante de ser alcançado.

6.3. Análise funcional de serpinb6

6.3.1. Escolha do sistema de transferência gênica

Um ponto importante no desenho de projetos de Genoma Funcional ou análise funcional de genes é a escolha do melhor modelo celular para estudo do gene de interesse e também da forma de transferência dos genes para este modelo. Neste projeto especificamente, conforme detalhado na Introdução, o modelo celular já estava bem determinado, porém o sistema de transferência dos genes de interesse para o modelo de estudo ainda estava para ser explorado. Alguns trabalhos de tese de ex-alunos do laboratório relatavam a dificuldade em encontrar um sistema plasmideal apropriado para a expressão ectópica de genes nas células ST1, pelo fato destas serem relativamente resistentes à transfecção e apresentarem alterações significativas de fenótipo mesmo quando transfectadas com o vetor vazio usado como controle negativo.

Inicialmente, decidimos utilizar mais uma vez um sistema plasmideal, no caso o vetor pDEST12.2 de expressão em células de mamífero, do então recém-lançado sistema Gateway (Invitrogen), que apresentava a vantagem de permitir a transferência do inserto, de um vetor para outro, por meio de transposição, de forma mais simples e eficiente do que a subclonagem tradicional.

As construções foram obtidas com sucesso, conforme discutido abaixo, porém não foi possível encontrar clones de células C6 ou ST1 super-expressando o gene de interesse, em diversas tentativas de transfecção realizadas. Os poucos clones obtidos apresentavam alterações de fenótipo, como por exemplo, tempo de dobramente extremamente elevado.

As células T98G apresentam alta eficiência de transfecção, portanto, facilmente foram obtidos clones e populações mistas de T98G super-expressando serpinb6.

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, colegas do laboratório obtiveram significativo sucesso utilizando um sistema retroviral de transferência gênica para as células ST1. O processo de produção de retrovírus recombinante baseado no vetor pLPCX e infecção de células ST1 foi padronizado e a partir deste momento passou a ser o método de escolha para transferência gênica no laboratório.

Os transfectantes de células T98G com construções plasmideais que já haviam sido obtidos com sucesso foram utilizados para análise funcional e retrovírus recombinantes foram produzidos para a geração de populações de células ST1.

Foram gerados retrovírus da porção codificante mutada e não mutada de *serpinb6* de rato, para comparação do seu efeito sobre as células e possível inferência sobre a importância dos sítios mutados, e também das construções *antisense* de rato e humano e *sense* de humano.

As seqüências de humano foram amplificadas e clonadas para que fossem utilizadas em análise funcional de células humanas, como T98G e A172. Entretanto, após os resultados de PCR em Tempo Real mostrando que *hPI(6)* não é regulado por ATRA nestas células, este objetivo foi deixado de lado e nos restringimos a fazer análise funcional dos transfectantes de T98G que já haviam sido obtidos e das populações infectadas de ST1.

6.3.2. Obtenção das construções de interesse

Inicialmente a porção codificante de *serpinb6* de rato foi clonada em pENTR 2B e transposta para pDEST12.2. Esta construção foi seqüenciada e mostrou as mutações já descritas.

Análise de Bioinformática da seqüência mutada mostrou que as mutações não se encontravam em regiões conservadas da proteína e que diferentes organismos apresentavam polimorfismos, nestas regiões, idênticos ou semelhantes às mutações encontradas.

Com base nesta observação, enquanto o resultado do seqüenciamento era confirmado e novas construções eram obtidas, optou-se por dar continuidade ao trabalho, gerando os clones de C6, ST1 e T98G transfectados com pDEST12.2-serpinb6-mut.

Após a confirmação do resultado do seqüenciamento, foi levantada a hipótese das mutações serem características de ST1, uma vez que esta linhagem provém de um glioma induzido com o agente mutagênico metilnitrosouréia. Para testar esta hipótese, amostras de RNA foram extraídas de populações independentes de ST1 e utilizadas para amplificação de serpinb6 por RT-PCR seguido de PCR. Estes produtos de PCR foram seqüenciados e mostraram 100% de identidade com a seqüência de referência depositada no *GenBank*, confirmando que a mutação ocorreu especificamente na seqüência clonada.

Uma destas seqüências não mutadas foi utilizada para clonagem em pENTR 2B novamente e este clone re-confirmado por seqüenciamento foi utilizado para a subclonagem de serpinb6 em pLPCX. A seqüência mutada também foi subclonada em pLPCX.

6.3.3. Análise das populações infectadas de células ST1

Partindo das células ST1 foram geradas populações infectadas com as diferentes construções retrovirais para super-expressar serpinb6, ou serpinb6-mut, ou para bloquear a expressão de serpinb6 (serpinb6-AS). As populações geradas foram analisadas por *Real Time PCR*, tendo sido possível encontrar uma população que expressa serpinb6 em nível seis vezes mais alto que do controle parental. Não foi possível encontrar uma população que super-expressasse a serpina mutada e esta foi excluída das análises. É possível que tenha havido algum problema no processo de seleção com puromicina.

No caso da população gerada com a construção *antisense*, não foi possível observar diminuição significativa na expressão de

serpinb6 através da técnica utilizada, o que pode ser devido à inadequação da metodologia de *Real Time PCR* para este tipo de análise.

O mecanismo pelo qual a metodologia de *antisense* funciona ainda não foi esclarecido. A hipótese inicial seria de inibição da expressão do gene alvo por hibridização e bloqueio, impedindo tradução do mensageiro que ficaria fisicamente impedido. Recentemente, com o advento da metodologia de RNA de interferência, surgiu a hipótese do mecanismo de *antisense* ser o mesmo do RNAi, havendo indução de degradação dos híbridos de RNA mensageiro.

Se o mecanismo de *antisense* for o primeiro, não é possível verificar a eficiência da construção por *Real Time PCR*, uma vez que as moléculas de RNA estão presentes, apenas inativas. Se o mecanismo for o mesmo do RNAi, deveria ser possível detectar esta diferença por PCR.

Um método ideal para verificação de inibição de expressão de um gene seria um método de análise protéica, como *Western blot*, porém por se tratar de uma proteína pertencente a uma grande família com grande similaridade entre os membros, os anticorpos contra serpinb6 não funcionam da maneira desejada.

Mesmo não tendo sido possível até o momento mostrar com clareza se a construção *antisense* inibiu realmente a expressão do gene alvo, esta população foi incluída nas análises funcionais. Foi possível observar ao microscópio óptico que na população em que serpinb6 está induzido, há alterações morfológicas semelhantes às aquelas observadas em células ST1 tratadas com ATRA.

O resultado da curva de crescimento, comparando as populações de células ST1 geradas, mostrou que não há diferença no tempo de dobramento ou densidade de saturação quando se compara ST1 parental com a população que super-expressa serpinb6 ou com a população gerada pelo método de *antisense*,

porém há aumento significativo no tempo de dobramento e diminuição na densidade de saturação das células tratadas com ATRA. O efeito de ATRA sobre as células ST1 parentais foi reproduzido da mesma forma que já havia sido visto em outros trabalhos do laboratório.

Todas as populações geradas respondem da mesma forma em ensaio de incorporação de timidina, sofrendo inibição significativa de crescimento na presença de ATRA, e o ensaio de MTT mostrou que não há alteração no número de células ou viabilidade celular no curto período testado.

A diferença mais interessante foi observada no ensaio de crescimento em suspensão de agarose. Ao contrário do que se esperava, as células que expressam mais serpinb6 geraram maior número de colônias e de tamanho significativamente maior, como pode ser visto no histograma correspondente (**Figura 38**). De alguma forma, a expressão mais elevada de serpinb6 conferiu alguma vantagem para o crescimento destas colônias. A população correspondente ao *antisense*, também gerou maior número de colônias, porém a vasta maioria das colônias formadas foi classificada como pequena em relação ao diâmetro.

O envolvimento de proteínas da família das serpinas com o desenvolvimento de tumores, já é bastante conhecido [174]. Entretanto, todos os relatos existentes são sobre a ação das serpinas extracelulares, envolvidas com mecanismos de invasão celular. Serpinb6 é um membro diferente desta família, sendo a primeira serpina intracelular descrita. Desta forma, seu envolvimento com invasão celular, um processo extracelular nunca foi considerado.

Os poucos relatos da literatura sobre a função desta proteína intracelular ainda desconhecida, geralmente mostram seu envolvimento com processos de lesão celular, inflamação e estresse, situações nas quais seu nível é induzido, possivelmente

para neutralizar proteases liberadas, de acordo com o exposto na Introdução.

Considerando a função já descrita de serpinb6 de ser induzida em processos de lesão celular e adversidade, é possível compreender que células que expressem níveis mais elevados de serpinb6 tenham melhores condições de crescer em suspensão de agarose, uma situação de adversidade, utilizando-se do efeito citoprotetor de mecanismo ainda desconhecido, atribuído a esta proteína.

Para complementar os dados obtidos com a análise funcional de serpinb6 e as informações obtidas da literatura em relação à possível função desta proteína e o possível mecanismo molecular da ação de ATRA, temos os resultados da análise proteômica deste trabalho, que mostraram a identificação de duas proteínas, GRP78 e Hsc70, as quais também são induzidas em situações de estresse celular.

É possível inferir que ATRA regule um conjunto de genes envolvidos diretamente com proliferação celular, como c-fos, SCGF e todos aqueles já descritos na literatura, como c-jun, c-myc, ciclinas, Rb, entre outros; e também regule a expressão de proteínas envolvidas com proteção celular em situações de estresse, onde seriam incluídos GRP78, Hsc70 e serpinb6. Estas proteínas teriam a função de manter o *status* de proliferação das células em condições menos favoráveis, como é o caso do crescimento em suspensão de agarose.

Quando isolado do efeito anti-proliferativo de todos os outros genes regulados por ATRA, a super-expressão de serpinb6 mostra-se vantajosa apenas em relação à taxa de crescimento em condição de "maior estresse", como quando não há suporte para ancoragem.

O envolvimento de ácido retinóico com estresse celular pode ser observado em diversas situações. Em alguns casos ATRA corresponde a um fator pró-estresse, porém em outros, sua função

é anti-estresse, corroborando os dados obtidos neste trabalho. O fator de crescimento LEDGF, por exemplo, um fator de proteção celular que transativa diversos outros fatores de proteção celular, também promove aumento dos níveis de ácido retinóico nas células onde atua [175]. Em osteoblastos, ácido retinóico sinergiza com TGF- β , elevando os níveis de HSP27, um fator anti-estresse. Mais uma vez temos a observação de situações divergentes quando células diferentes são tratadas com retinóides, reforçando a complexidade do seu estudo.

6.3.4. Análise dos transfectantes de T98G

Os transfectantes de T98G, obtidos utilizando-se a construção pDEST12.2-serpinb6-mut, foram analisados com base em sua morfologia, e pela realização de ensaios funcionais, como: curvas de crescimento, crescimento em suspensão de agarose, incorporação de timidina e MTT, sempre comparando-se as células parentais com as células transfectadas com o vetor vazio (pDEST12.2-neg) e as células transfectadas com a construção pDEST12.2-serpinb6-mut. A super-expressão de serpinb6 em T98G foi confirmada por *Real Time PCR*.

Em relação à morfologia, não foi possível observar nenhuma diferença entre as três populações estudadas. O tratamento das células parentais com 10^{-5} M ATRA parece induzir maior achatamento celular, porém não ocorre re-organização tão evidente das células como se observa em ST1.

Nos ensaios de curva de crescimento, não foi possível observar diferença significativa alguma entre as populações analisadas. É possível afirmar apenas que há uma tendência das células parentais tratadas com 10^{-5} M ATRA apresentarem menor densidade de saturação, porém pelo número de ensaios realizados, esta observação não é estatisticamente significativa.

Nos ensaios de incorporação de timidina, houve efeito significativo de ATRA sobre as populações analisadas. Tanto as células parentais quanto os transfectantes responderam da mesma forma ao tratamento.

Parece incongruente pensar que não há alteração na curva de crescimento de T98G tratada com ATRA, enquanto há indicação de inibição de proliferação pelo ensaio de incorporação de timidina. Entretanto, é importante ressaltar que o ensaio de incorporação de timidina verifica a taxa de duplicação do DNA das células em um momento muito restrito. As células foram incubadas com timidina apenas por 6h, enquanto a curva de crescimento mostra intervalos de 48h. É possível que ATRA induza parada de crescimento em períodos curtos, mas as células utilizem outros mecanismos para voltar a proliferar, não sendo portanto possível observar diferenças quando se faz uma avaliação de crescimento em períodos mais longos. Esta observação pode refletir o que ocorre quando tumores humanos são tratados com ATRA e rapidamente ocorre o aparecimento de resistência.

No ensaio de MTT, não houve diferença significativa entre as populações analisadas, mostrando que todas as populações, tratadas ou não com ATRA estão com metabolismo ativo na mesma intensidade e que no curto período analisado (24h), não há diferença significativa no número de células entre as populações comparadas, com ou sem tratamento.

Este resultado do ensaio de MTT foi interessante para mostrar também que a concentração de ATRA que vem sendo utilizada não é tóxica para as células, pelo menos neste período de 24h.

O ensaio de crescimento em suspensão de agarose foi feito duas vezes em duplicata, porém houve problemas técnicos em um deles, e portanto este resultado representa apenas a duplicata de um experimento, mostrando a supressão total do crescimento das células parentais tratadas com ATRA e intensa inibição de

crescimento das células transfectadas com pDEST12.2-serpinb6-mut. Entretanto, como não foi possível observar o resultado do experimento independente, não se pode afirmar nada sobre o efeito desta construção em T98G, principalmente pelo fato de haver diferença significativa de comportamento entre diferentes populações de T98G.

A partir do momento em que foi verificado que ATRA não induz a expressão de serpinb6 em T98G por *Real Time PCR*, não esperávamos que a super-expressão deste gene nestas células pudesse induzir algum efeito.

Estas células formam colônias bastante diminutas em suspensão de agarose e o resultado observado pode ser um artefato, devendo ser repetido para confirmação.

7. CONCLUSÃO

7.1. Conclusões Parciais

- Utilizando o enfoque proteômico (2D-PAGE e MALDI-TOF), foi possível encontrar proteínas envolvidas com o efeito de ATRA nas células ST1 de glioma de rato. As proteínas identificadas podem ser divididas em três grupos principais: controle da proliferação celular (c-fos e SCGF), citoesqueleto (actina e tubulina) e proteção celular em estados de estresse (GRP78 e Hsc70). A proteína TCTP identificada parece estar envolvida com estes três grupos.
- A metodologia utilizada não foi adequada para encontrar proteínas envolvidas com o efeito de ATRA nas células T98G de glioma humano, possivelmente porque o efeito de ATRA nestas células é mais sutil exigindo técnicas mais sensíveis para detecção.
- A expressão de serpinb6 (nível de transcrito) é induzida por ATRA nas células de glioma de rato C6 e ST1, porém o homólogo humano hPI(6) não sofre modulação induzida por ATRA nas linhagens de glioma humano T98G e A172.
- A porção codificante completa de serpinb6 de rato, bem como do homólogo humano hPI(6) e fragmentos *antisense* dos referidos genes foi amplificada e clonada com sucesso nos vetores de interesse, sendo analisados e validados por seqüenciamento automático de DNA.
- O método de transferência gênica através de vetores retrovirais se mostrou significativamente mais eficiente nas células ST1 do que o método de transfecção com construções plasmideais. Entretanto, construções plasmideais funcionaram bem para transferir o gene de interesse para as células T98G.
- Foi possível obter populações de células T98G transfectadas com construções plasmideais e populações de células ST1 infectadas com retrovírus recombinante que super-expressam serpinb6 para análise funcional.

- A análise funcional das populações de ST1 geradas mostrou que as células que super-expressam serpinb6 apresentam alterações morfológicas semelhantes às aquelas induzidas por ATRA nas células parentais utilizadas como controle e têm maior capacidade de crescimento em suspensão de agarose, mas não diferem dos controles em outros parâmetros, como curva de crescimento, incorporação de timidina e MTT.
- A análise funcional das populações de T98G geradas não mostrou efeito significativo da super-expressão de serpinb6, mas apenas uma tendência a formar menor número de colônias em suspensão de agarose, o que ainda precisa ser confirmado.
- O resultado da análise funcional nas células ST1, acompanhado de dados da literatura sobre serpinb6, coloca esta proteína na lista das proteínas envolvidas com proteção celular, ao lado de GRP78 e Hsc70, mostrando a importância deste grupo de proteínas na reversão fenotípica tumoral-normal de células ST1 e a complementaridade das metodologias utilizadas para buscar componentes moleculares envolvidos com o efeito de ATRA sobre estas células

7.2. Conclusões Gerais

- Utilizando dois enfoques distintos (Proteoma e Genoma Funcional), foi possível identificar proteínas envolvidas com o processo de reversão fenotípica tumoral normal das células ST1 de glioma de rato.
- Foi possível verificar a importância de proteínas envolvidas com proteção e estresse celular (Hsc70, GRP78, TCTP, serpinb6) no processo de reversão fenotípica estudado.
- Foi possível verificar a heterogeneidade molecular dos gliomas, através do estudo de expressão induzida de serpinb6 e seu homólogo humano em linhagens celulares estabelecidas de glioma.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Bloom DW, Fawcett J. A Textbook of histology, 12th ed. Chapman & Hall, 1994.
- [2] Pfrieger FW, Barres BA. What the fly's glia tell the fly's brain. *Cell* 1995;83(5):671-4.
- [3] Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 2001;409(6821):714-20.
- [4] Toresson H, Mata de Urquiza A, Fagerstrom C, Perlmann T, Campbell K. Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development* 1999;126(6):1317-26.
- [5] Gimenez y Ribotta M, Menet V, Privat A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog Brain Res* 2001;132:587-610.
- [6] Zhao Z, Alam S, Oppenheim RW, Prevett DM, Evenson A, Parsadanian A. Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy. *Exp Neurol* 2004;190(2):356-72.
- [7] Coles JA, Abbott NJ. Signalling from neurones to glial cells in invertebrates. *Trends Neurosci* 1996;19(8):358-62.
- [8] Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;47(1-3):191-215.
- [9] Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 2000;30(2):105-21.
- [10] Sauvageot CM, Stiles CD. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12(3):244-9.
- [11] Liu Y, Han SS, Wu Y, Tuohy TM, Xue H, Cai J, Back SA, Sherman LS, Fischer I, Rao MS. CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Dev Biol* 2004;276(1):31-46.
- [12] Akbasak A, Sunar-Akbasak B. Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumors. *J Neurol Sci* 1992;111(2):119-33.
- [13] Kanzawa T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Current and Future Gene Therapy for Malignant Gliomas. *J Biomed Biotechnol* 2003;2003(1):25-34.
- [14] Grossman SA, Bataia JF. Current management of glioblastoma multiforme. *Semin Oncol* 2004;31(5):635-44.
- [15] Montagne K, Marie B, Cahn V, Hennequin V, Didelot A, N'Seir R, Beauchesne P, Grignon Y. [Systemic metastasis at the time of diagnosis of a glioblastoma.]. *Ann Pathol* 2004;24(3):268-70.
- [16] Freshney RI. Effects of glucocorticoids on glioma cells in culture. Minireview on cancer research. *Exp Cell Biol* 1984;52(5):286-92.
- [17] See SJ, Levin VA, Yung WK, Hess KR, Groves MD. 13-cis-retinoic acid in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Neuro-oncol* 2004;6(3):253-8.
- [18] Niles RM. Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition* 2000;16(11-12):1084-9.

- [19] Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol* 2001;159(3):779-86.
- [20] Glotsos D, Spyridonos P, Petalas P, Cavouras D, Ravazoula P, Dadioti PA, Lekka I, Nikiforidis G. Computer-based malignancy grading of astrocytomas employing a support vector machine classifier, the WHO grading system and the regular hematoxylin-eosin diagnostic staining procedure. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26(2):77-83.
- [21] van den Bent MJ. Diagnosis and management of oligodendroglioma. *Semin Oncol* 2004;31(5):645-52.
- [22] Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K. Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol* 2004;16(6):607-13.
- [23] Giammarile F, Cinotti LE, Jouvet A, Ramackers JM, Saint Pierre G, Thiesse P, Jouanneau E, Guyotat J, Pelissou-Guyotat I, Setiey A, Honnorat J, Le Bars D, Frappaz D. High and low grade oligodendrogliomas (ODG): correlation of amino-acid and glucose uptakes using PET and histological classifications. *J Neurooncol* 2004;68(3):263-74.
- [24] Varela M, Ranuncolo SM, Morand A, Lastiri J, De Kier Joffe EB, Puricelli LI, Pallotta MG. EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. *J Surg Oncol* 2004;86(1):34-40.
- [25] Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E, Hegi ME. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* 2003;63(20):6613-25.
- [26] Shai R, Shi T, Kremen TJ, Horvath S, Liao LM, Cloughesy TF, Mischel PS, Nelson SF. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. *Oncogene* 2003;22(31):4918-23.
- [27] Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 2003;63(7):1602-7.
- [28] Shostak K, Labunskyy V, Dmitrenko V, Malisheva T, Shamayev M, Rozumenko V, Zozulya Y, Zehetner G, Kavsan V. HC gp-39 gene is upregulated in glioblastomas. *Cancer Lett* 2003;198(2):203-10.
- [29] Magrassi L, Butti G, Pezzotta S, Infuso L, Milanesi G. Effects of vitamin D and retinoic acid on human glioblastoma cell lines. *Acta Neurochir (Wien)* 1995;133(3-4):184-90.
- [30] Bouterfa H, Picht T, Kess D, Herbold C, Noll E, Black PM, Roosen K, Tonn JC. Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines. *Neurosurgery* 2000;46(2):419-30.
- [31] Yung WK, Kyritsis AP, Gleason MJ, Levin VA. Treatment of recurrent malignant gliomas with high-dose 13-cis-retinoic acid. *Clin Cancer Res* 1996;2(12):1931-5.

- [32] Puduvalli VK, Yung WK, Hess KR, Kuhn JG, Groves MD, Levin VA, Zwiebel J, Chang SM, Cloughesy TF, Junck L, Wen P, Lieberman F, Conrad CA, Gilbert MR, Meyers CA, Liu V, Mehta MP, Nicholas MK, Prados M. Phase II study of fenretinide (NSC 374551) in adults with recurrent malignant gliomas: A North American Brain Tumor Consortium study. *J Clin Oncol* 2004;22(21):4282-9.
- [33] Jaeckle KA, Hess KR, Yung WK, Greenberg H, Fine H, Schiff D, Pollack IF, Kuhn J, Fink K, Mehta M, Cloughesy T, Nicholas MK, Chang S, Prados M. Phase II evaluation of temozolomide and 13-cis-retinoic acid for the treatment of recurrent and progressive malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *J Clin Oncol* 2003;21(12):2305-11.
- [34] Wismeth C, Hau P, Fabel K, Baumgart U, Hirschmann B, Koch H, Jauch T, Grauer O, Drechsel L, Brawanski A, Bogdahn U, Steinbrecher A. Maintenance therapy with 13-cis retinoid acid in high-grade glioma at complete response after first-line multimodal therapy--a phase-II study. *J Neurooncol* 2004;68(1):79-86.
- [35] Defer GL, Adle-Biasette H, Ricolfi F, Martin L, Authier FJ, Chomienne C, Degos L, Degos JD. All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. *J Neurooncol* 1997;34(2):169-77.
- [36] Gettinger S, Shapira I, Scheinfeld N, Grossbard M. Complications of therapy in cancer patients: Case 2. Scrotal ulceration during all-trans-retinoic acid therapy for acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2004;22(22):4648-9.
- [37] Holland EC. Progenitor cells and glioma formation. *Curr Opin Neurol* 2001;14(6):683-8.
- [38] Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* 2004;6(25):1-23.
- [39] Sanz MA, Vellenga E, Rayon C, Diaz-Mediavilla J, Rivas C, Amutio E, Arias J, Deben G, Novo A, Bergua J, de la Serna J, Bueno J, Negri S, Beltran de Heredia JM, Martin G. All-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for the treatment of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2004;104(12):3490-3.
- [40] Jimenez-Lara AM, Clarke N, Altucci L, Gronemeyer H. Retinoic-acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Trends Mol Med* 2004;10(10):508-15.
- [41] Kambhampati S, Verma A, Li Y, Parmar S, Sassano A, Plataniias LC. Signalling pathways activated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2004;45(11):2175-85.
- [42] Advani SH, Nair R, Bapna A, Gladstone B, Kadam P, Saikia TK, Parekh PM, Gopal R, Nair CN. Acute promyelocytic leukemia: all-trans retinoic acid (ATRA) along with chemotherapy is superior to ATRA alone. *Am J Hematol* 1999;60(2):87-93.
- [43] De Graaf YG, Euvrard S, Bouwes Bavinck JN. Systemic and topical retinoids in the management of skin cancer in organ transplant recipients. *Dermatol Surg* 2004;30(4 Pt 2):656-61.

- [44] Mrass P, Rendl M, Mildner M, Gruber F, Lengauer B, Ballaun C, Eckhart L, Tschachler E. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res* 2004;64(18):6542-8.
- [45] Jeong YI, Song JG, Kang SS, Ryu HH, Lee YH, Choi C, Shin BA, Kim KK, Ahn KY, Jung S. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid. *Int J Pharm* 2003;259(1-2):79-91.
- [46] Merino R, Hurle JM. The molecular basis of retinoid action in tumors. *Trends Mol Med* 2003;9(12):509-11.
- [47] Bartolini G, Ammar K, Mantovani B, Scanabissi F, Ferreri AM, Rocchi P, Orlandi M. Retinoids and cancer: antitumor effect of ATRA and of a new derivative of retinoic acid, IIF, on colon carcinoma cell lines CaCo-2 and HT-29. *Anticancer Res* 2004;24(3a):1779-83.
- [48] Fischer I, Nolan CE, Shea TB. Effects of retinoic acid on expression of the transformed phenotype in C6 glioma cells. *Life Sci* 1987;41(4):463-70.
- [49] Hesselager G, Holland EC. Using mice to decipher the molecular genetics of brain tumors. *Neurosurgery* 2003;53(3):685-94; discussion 95.
- [50] Jin P, Zhang QL, Liu FS, Wang BA, Wei L, Wang CW, Kong JX. [Establishment of drug-resistance cell line of human glioma mediated by MGMT]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2002;24(6):596-600.
- [51] Grippo MC, Penteado PF, Carelli EF, Cruz-Hofling MA, Verinaud L. Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line: NG97. *Cell Mol Neurobiol* 2001;21(4):421-8.
- [52] Kurimoto M, Hirashima Y, Ogiuchi T, Hamada H, Kamiyama H, Endo S. Establishment and characterization of a novel malignant astrocytoma cell line derived from a tumor removed in a patient with neurofibromatosis type 1. *J Neurosurg* 2001;94(2):301-8.
- [53] Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 1968;161(839):370-1.
- [54] Pandita A, Aldape KD, Zadeh G, Guha A, James CD. Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39(1):29-36.
- [55] Armelin MC, Garrido J, Armelin HA. RNA tumor virus production accompanies the transformed phenotype change induced by hydrocortisone hormone in rat glioma cells. *Cell Biol Int Rep* 1983;7(9):689-96.
- [56] Armelin MC, Stocco RC, Armelin HA. Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures. *J Cell Biol* 1983;97(2):455-8.
- [57] Romero-Ramirez L, Nieto-Sampedro M. Inhibiting human astrocytoma growth: structure-activity relationships in neurostatin related glycolipids. *J Med Chem* 2004;47(21):4983-4.
- [58] Yaz G, Kabadere S, Oztopcu P, Durmaz R, Uyar R. Comparison of the antiproliferative properties of antiestrogenic drugs (nafoxidine

- and clomiphene) on glioma cells in vitro. *Am J Clin Oncol* 2004;27(4):384-8.
- [59] Pu P, Kang C, Li J, Jiang H. Antisense and dominant-negative AKT2 cDNA inhibits glioma cell invasion. *Tumour Biol* 2004;25(4):172-8.
- [60] Matsuno A, Nagashima T. Specific gene suppression using antisense strategy for growth suppression of glioma. *Med Electron Microsc* 2004;37(3):158-61.
- [61] Saito R, Mizuno M, Kumabe T, Yoshimoto T, Tanuma S, Yoshida J. Apoptotic DNA endonuclease (DNase-gamma) gene transfer induces cell death accompanying DNA fragmentation in human glioma cells. *J Neurooncol* 2003;63(1):25-31.
- [62] Harada H, Nakagawa K, Saito M, Kohno S, Nagato S, Furukawa K, Kumon Y, Hamada K, Ohnishi T. Introduction of wild-type p53 enhances thrombospondin-1 expression in human glioma cells. *Cancer Lett* 2003;191(1):109-19.
- [63] Armelin MC, Oliveira ML, Mercado JM, Sasahara RM, Valentini SR, Carvalho LH. Molecular genetic approach to cell proliferation control and neoplasia. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(7):911-9.
- [64] Vedoy CG, Bengtson MH, Sogayar MC. Hunting for differentially expressed genes. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(7):877-84.
- [65] Zhang WL, Tsuneishi S, Nakamura H. Induction of heat shock proteins and its effects on glial differentiation in rat C6 glioblastoma cells. *Kobe J Med Sci* 2001;47(2):77-95.
- [66] Valentini SR, Armelin MC. Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *J Endocrinol* 1996;148(1):11-7.
- [67] Vedoy CG, Sogayar MC. Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;106(1-2):57-69.
- [68] Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine* Raven Press, 1994.
- [69] Gottesman ME, Quadro L, Blaner WS. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 2001;23(5):409-19.
- [70] Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 1992;17(10):427-33.
- [71] Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 1996;10(9):940-54.
- [72] Petkovich M. Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoic acid receptors. *Annu Rev Nutr* 1992;12:443-71.
- [73] Yu VC, Delsert C, Andersen B, Holloway JM, Devary OV, Naar AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 1991;67(6):1251-66.
- [74] Ruberte E, Friederich V, Chambon P, Morriss-Kay G. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development* 1993;118(1):267-82.
- [75] Nagai J, Yazawa T, Okudela K, Kigasawa H, Kitamura H, Osaka H. Retinoic acid induces neuroblastoma cell death by inhibiting

- proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Cancer Res* 2004;64(21):7910-7.
- [76] del Rincon SV, Guo Q, Morelli C, Shiu HY, Surmacz E, Miller WH. Retinoic acid mediates degradation of IRS-1 by the ubiquitin-proteasome pathway, via a PKC-dependant mechanism. *Oncogene* 2004;23(57):9269-79.
- [77] McCaffery P, Drager UC. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11(3):233-49.
- [78] Sharif KA, Baker H, Gudas LJ. Differential regulation of laminin b1 transgene expression in the neonatal and adult mouse brain. *Neuroscience* 2004;126(4):967-78.
- [79] Lee JH, Kim KT. Induction of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 through the extracellular-signal-regulated kinase and protein kinase A pathways during retinoic-acid mediated neuronal differentiation in human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *J Neurochem* 2004;91(3):634-47.
- [80] Wu Q, Chen ZM, Su WJ. Anticancer effect of retinoic acid via AP-1 activity repression is mediated by retinoic acid receptor alpha and beta in gastric cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(9):1102-14.
- [81] Huang Y, Boskovic G, Niles RM. Retinoic acid-induced AP-1 transcriptional activity regulates B16 mouse melanoma growth inhibition and differentiation. *J Cell Physiol* 2003;194(2):162-70.
- [82] Yu Z, Lin J, Xiao Y, Han J, Zhang X, Jia H, Tang Y, Li Y. Induction of Cell-Cycle Arrest by all-trans Retinoic Acid in Mouse Embryonic Palatal Mesenchymal (MEPM) Cells. *Toxicol Sci* 2005;83(2):349-54.
- [83] Naderi S, Blomhoff HK. Retinoic acid prevents phosphorylation of pRB in normal human B lymphocytes: regulation of cyclin E, cyclin A, and p21(Cip1). *Blood* 1999;94(4):1348-58.
- [84] Wainwright LJ, Lasorella A, Iavarone A. Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(16):9396-400.
- [85] He Q, Peng H, Collins SJ, Triche TJ, Wu L. Retinoid-modulated MAT1 ubiquitination and CAK activity. *Faseb J* 2004;18(14):1734-6.
- [86] Dragnev KH, Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Cyclin proteolysis as a retinoid cancer prevention mechanism. *Ann N Y Acad Sci* 2001;952:13-22.
- [87] Gumireddy K, Sutton LN, Phillips PC, Reddy CD. All-trans-retinoic acid-induced apoptosis in human medulloblastoma: activation of caspase-3/poly(ADP-ribose) polymerase 1 pathway. *Clin Cancer Res* 2003;9(11):4052-9.
- [88] Niles RM. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* 2004;555(1-2):81-96.
- [89] Pavithran K, Arjun R, Aruna R, Thomas M. Scrotal ulceration during induction therapy of acute promyelocytic leukemia with ATRA. *Am J Hematol* 2004;75(4):260-1.
- [90] de-Medeiros BC, Strapasson E, Pasquini R, de-Medeiros CR. Effect of all-trans retinoic acid on newly diagnosed acute promyelocytic leukemia patients: results of a Brazilian center. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(12):1537-43.

- [91] Park SH, Gray WC, Hernandez I, Jacobs M, Ord RA, Sutharalingam M, Smith RG, Van Echo DA, Wu S, Conley BA. Phase I trial of all-trans retinoic acid in patients with treated head and neck squamous carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(3):847-54.
- [92] Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskaas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000;287(5461):2185-95.
- [93] Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, Scott G, Steffen D, Worley KC, Burch PE, Okwuonu G, Hines S, Lewis L, DeRamo C, Delgado O, Dugan-Rocha S, Miner G, Morgan M, Hawes A, Gill R, Celera, Holt RA, Adams MD, Amanatides PG, Baden-Tillson H, Barnstead M, Chin S, Evans CA, Ferriera S, Fosler C, Glodek A, Gu Z, Jennings D, Kraft CL, Nguyen T, Pfannkoch CM, Sitter C, Sutton GG, Venter JC, Woodage T, Smith D, Lee HM, Gustafson E, Cahill P, Kana A, Doucette-Stamm L, Weinstock K, Fechtel K, Weiss RB, Dunn DM, Green ED, Blakesley RW, Bouffard GG, De Jong PJ, Osoegawa K, Zhu B, Marra M, Schein J, Bosdet I, Fjell C, Jones S, Krzywinski M, Mathewson C, Siddiqui A, Wye N, McPherson J, Zhao S, Fraser CM, Shetty J, Shatsman S, Geer K, Chen Y, Abramzon S, Nierman WC, Havlak PH, Chen R,

- Durbin KJ, Egan A, Ren Y, Song XZ, Li B, Liu Y, Qin X, Cawley S, Cooney AJ, D'Souza LM, Martin K, Wu JQ, Gonzalez-Garay ML, Jackson AR, Kalafus KJ, McLeod MP, Milosavljevic A, Virk D, Volkov A, Wheeler DA, Zhang Z, Bailey JA, Eichler EE, Tuzun E, Birney E, Mongin E, Ureta-Vidal A, Woodwark C, Zdobnov E, Bork P, Suyama M, Torrents D, Alexandersson M, Trask BJ, Young JM, Huang H, Wang H, Xing H, Daniels S, Gietzen D, Schmidt J, Stevens K, Vitt U, Wingrove J, Camara F, Mar Alba M, Abril JF, Guigo R, Smit A, Dubchak I, Rubin EM, Couronne O, Poliakov A, Hubner N, Ganten D, Goesele C, Hummel O, Kreitler T, Lee YA, Monti J, Schulz H, Zimdahl H, Himmelbauer H, Lehrach H, Jacob HJ, Bromberg S, Gullings-Handley J, Jensen-Seaman MI, Kwitek AE, Lazar J, Pasko D, Tonellato PJ, Twigger S, Ponting CP, Duarte JM, Rice S, Goodstadt L, Beatson SA, Emes RD, Winter EE, Webber C, Brandt P, Nyakatura G, Adetobi M, Chiaromonte F, Elnitski L, Eswara P, Hardison RC, Hou M, Kolbe D, Makova K, Miller W, Nekrutenko A, Riemer C, Schwartz S, Taylor J, Yang S, Zhang Y, Lindpaintner K, Andrews TD, Caccamo M, Clamp M, Clarke L, Curwen V, Durbin R, Eyras E, Searle SM, Cooper GM, Batzoglou S, Brudno M, Sidow A, Stone EA, Payseur BA, Bourque G, Lopez-Otin C, Puente XS, Chakrabarti K, Chatterji S, Dewey C, Pachter L, Bray N, Yap VB, Caspi A, Tesler G, Pevzner PA, Haussler D, Roskin KM, Baertsch R, Clawson H, Furey TS, Hinrichs AS, Karolchik D, Kent WJ, Rosenbloom KR, Trumbower H, Weirauch M, Cooper DN, Stenson PD, Ma B, Brent M, Arumugam M, Shteynberg D, Copley RR, Taylor MS, Riethman H, Mudunuri U, Peterson J, Guyer M, Felsenfeld A, Old S, Mockrin S, Collins F. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004;428(6982):493-521.
- [94] Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C,

- Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291(5507):1304-51.
- [95] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt

- R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921.
- [96] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000;405(6788):837-46.
- [97] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003;422(6928):198-207.
- [98] Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996;13:19-50.
- [99] LaBaer J. Genomics, proteomics, and the new paradigm in biomedical research. *Genet Med* 2002;4(6 Suppl):2S-9S.
- [100] Sogayar MC, Camargo AA, Bettoni F, Carraro DM, Pires LC, Parmigiani RB, Ferreira EN, de Sa Moreira E, do Rosario DdOLM, Simpson AJ, Cruz LO, Degaki TL, Festa F, Massirer KB, Filho FC, Camargo LP, Cunha MA, De Souza SJ, Faria M, Jr., Giuliatti S, Kopp L, de Oliveira PS, Paiva PB, Pereira AA, Pinheiro DG, Puga RD, JE SdS, Albuquerque DM, Andrade LE, Baia GS, Briones MR, Cavaleiro-Luna AM, Cerutti JM, Costa FF, Costanzi-Strauss E, Espreafico EM, Ferrasi AC, Ferro ES, Fortes MA, Furchi JR, Giannella-Neto D, Goldman GH, Goldman MH, Gruber A, Guimaraes GS, Hackel C, Henrique-Silva F, Kimura ET, Leoni SG, Macedo C, Malnic B, Manzini BC, Marie SK, Martinez-Rossi NM, Menossi M, Miracca EC, Nagai MA, Nobrega FG, Nobrega MP, Oba-Shinjo SM, Oliveira MK, Orabona GM, Otsuka AY, Paco-Larson ML, Paixao BM, Pandolfi JR, Pardini MI, Passos Bueno MR, Passos GA, Pesquero JB, Pessoa JG, Rahal P, Rainho CA, Reis CP, Ricca TI, Rodrigues V, Rogatto SR, Romano CM, Romeiro JG, Rossi A, Sa RG, Sales MM, Sant'Anna SC, Santarosa PL, Segato F, Silva WA, Jr., Silva ID, Silva NP, Soares-Costa A, Sonati MF, Strauss BE, Tajara EH, Valentini SR, Villanova FE, Ward LS, Zanette DL. A transcript finishing initiative for closing gaps in the human transcriptome. *Genome Res* 2004;14(7):1413-23.
- [101] Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1720-30.
- [102] Gravett MG, Novy MJ, Rosenfeld RG, Reddy AP, Jacob T, Turner M, McCormack A, Lapidus JA, Hitti J, Eschenbach DA, Roberts CT, Jr., Nagalla SR. Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic

- profiling and identification of novel biomarkers. *Jama* 2004;292(4):462-9.
- [103] Yuan X, Desiderio DM. Proteomics analysis of prefractionated human lumbar cerebrospinal fluid. *Proteomics* 2005.
- [104] Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, Eisenstein S, Rosen B, Lau AY, Walter JC, LaBaer J. Self-assembling protein microarrays. *Science* 2004;305(5680):86-90.
- [105] Washburn MP, Ulaszek RR, Yates JR, 3rd. Reproducibility of quantitative proteomic analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. *Anal Chem* 2003;75(19):5054-61.
- [106] Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR, 3rd. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1999;17(7):676-82.
- [107] Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999;17(10):994-9.
- [108] Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2000;403(6770):623-7.
- [109] O'Farrell PH. High Resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975;250:4007-21.
- [110] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21(6):1037-53.
- [111] Simpson RJ. *Proteins and Proteomics - A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- [112] Pennington SR, Dunn MJ. *Proteomics: From protein sequence to function* Bios, 2001.
- [113] Zhang R, Tremblay TL, McDermid A, Thibault P, Stanimirovic D. Identification of differentially expressed proteins in human glioblastoma cell lines and tumors. *Glia* 2003;42(2):194-208.
- [114] Zheng PP, Luider TM, Pieters R, Avezaat CJ, van den Bent MJ, Sillevius Smitt PA, Kros JM. Identification of tumor-related proteins by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with primary brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62(8):855-62.
- [115] Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H, Watanabe T, Ohama E, Tahimic CG, Kurimasa A, Oshimura M. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(3):558-66.
- [116] Bengtson MH. Caracterização celular e molecular dos efeitos do ácido retinóico sobre as células ST1 de glioma de rato Departamento de Bioquímica. São Paulo: USP, 2002.
- [117] Scott FL, Coughlin PB, Bird C, Cerruti L, Hayman JA, Bird P. Proteinase inhibitor 6 cannot be secreted, which suggests it is a new type of cellular serpin. *J Biol Chem* 1996;271(3):1605-12.

- [118] Sun J, Ooms L, Bird CH, Sutton VR, Trapani JA, Bird PI. A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9). *J Biol Chem* 1997;272(24):15434-41.
- [119] Hirai K, Koizumi K, Haraguchi S, Hirata T, Mikami I, Fukushima M, Yamagishi S, Kawashima T, Okada D, Shimizu K, Kawamoto M. Prognostic significance of the tumor suppressor gene maspin in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005;79(1):248-53.
- [120] Chen MC, Schuit F, Pipeleers DG, Eizirik DL. IL-1 β induces serine protease inhibitor 3 (SPI-3) gene expression in rat pancreatic beta-cells. Detection by differential display of messenger RNA. *Cytokine* 1999;11(11):856-62.
- [121] Kordula T, Travis J. The role of Stat and C/EBP transcription factors in the synergistic activation of rat serine protease inhibitor-3 gene by interleukin-6 and dexamethasone. *Biochem J* 1996;313 (Pt 3):1019-27.
- [122] Nakaya N, Nishibori M, Wang Z, Sakiyama J, Saeki K. The expression and localization of serine proteinase inhibitor PI-6 mRNA in developmental and ischemic mouse brain. *Neurosci Res* 1998;32(3):221-30.
- [123] Kato K, Kishi T, Kamachi T, Akisada M, Oka T, Midorikawa R, Takio K, Dohmae N, Bird PI, Sun J, Scott F, Miyake Y, Yamamoto K, Machida A, Tanaka T, Matsumoto K, Shibata M, Shiosaka S. Serine proteinase inhibitor 3 and murinoglobulin I are potent inhibitors of neuropsin in adult mouse brain. *J Biol Chem* 2001;276(18):14562-71.
- [124] Scarff KL, Ung KS, Nandurkar H, Crack PJ, Bird CH, Bird PI. Targeted disruption of SPI3/Serpina6 does not result in developmental or growth defects, leukocyte dysfunction, or susceptibility to stroke. *Mol Cell Biol* 2004;24(9):4075-82.
- [125] Scarff KL, Ung KS, Sun J, Bird PI. A retained selection cassette increases reporter gene expression without affecting tissue distribution in SPI3 knockout/GFP knock-in mice. *Genesis* 2003;36(3):149-57.
- [126] Strik MC, Wolbink A, Wouters D, Bladergroen BA, Verlaan AR, van Houdt IS, Hijlkema S, Hack CE, Kummer JA. Intracellular serpin SERPINB6 (PI6) is abundantly expressed by human mast cells and forms complexes with beta-tryptase monomers. *Blood* 2004;103(7):2710-7.
- [127] Mikolajczyk SD, Millar LS, Marker KM, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Marks LS, Charlesworth MC, Tindall DJ. Identification of a novel complex between human kallikrein 2 and protease inhibitor-6 in prostate cancer tissue. *Cancer Res* 1999;59(16):3927-30.
- [128] Saedi MS, Zhu Z, Marker K, Liu RS, Carpenter PM, Rittenhouse H, Mikolajczyk SD. Human kallikrein 2 (hK2), but not prostate-specific antigen (PSA), rapidly complexes with protease inhibitor 6 (PI-6) released from prostate carcinoma cells. *Int J Cancer* 2001;94(4):558-63.
- [129] Scott FL, Paddle-Ledinek JE, Cerruti L, Coughlin PB, Salem HH, Bird PI. Proteinase inhibitor 6 (PI-6) expression in human skin: induction of PI-6 and a PI-6/proteinase complex during keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res* 1998;245(2):263-71.

- [130] Ohike N, Maass N, Mundhenke C, Biallek M, Zhang M, Jonat W, Luttgies J, Morohoshi T, Kloppel G, Nagasaki K. Clinicopathological significance and molecular regulation of maspin expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Lett* 2003;199(2):193-200.
- [131] Kim DH, Yoon DS, Dooley WC, Nam ES, Ryu JW, Jung KC, Park HR, Sohn JH, Shin HS, Park YE. Association of maspin expression with the high histological grade and lymphocyte-rich stroma in early-stage breast cancer. *Histopathology* 2003;42(1):37-42.
- [132] Sugimoto S, Maass N, Takimoto Y, Sato K, Minei S, Zhang M, Hoshikawa Y, Junemann KP, Jonat W, Nagasaki K. Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in human bladder cancer. *Cancer Lett* 2004;203(2):209-15.
- [133] Cao Y, Lundwall A, Gadaleanu V, Lilja H, Bjartell A. Anti-thrombin is expressed in the benign prostatic epithelium and in prostate cancer and is capable of forming complexes with prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2. *Am J Pathol* 2002;161(6):2053-63.
- [134] Miao RQ, Agata J, Chao L, Chao J. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2002;100(9):3245-52.
- [135] Stein GH. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol* 1979;99(1):43-54.
- [136] Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51(5):1417-23.
- [137] Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 1969;4(5):549-53.
- [138] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [139] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology* Wiley, 2001.
- [140] Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18(24):5294-9.
- [141] Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(11):3746-50.
- [142] Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AF. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem* 2002;307(1):63-9.
- [143] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45.
- [144] Silva AP, Salim AC, Bulgarelli A, de Souza JE, Osorio E, Caballero OL, Iseli C, Stevenson BJ, Jongeneel CV, de Souza SJ, Simpson AJ, Camargo AA. Identification of 9 novel transcripts and two RGSL genes within the hereditary prostate cancer region (HPC1) at 1q25. *Gene* 2003;310:49-57.

- [145] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072(2-3):129-57.
- [146] Smith ER, Smedberg JL, Rula ME, Xu XX. Regulation of Ras-MAPK pathway mitogenic activity by restricting nuclear entry of activated MAPK in endoderm differentiation of embryonic carcinoma and stem cells. *J Cell Biol* 2004;164(5):689-99.
- [147] Hiraoka A, Yano Ki K, Kagami N, Takeshige K, Mio H, Anazawa H, Sugimoto S. Stem cell growth factor: in situ hybridization analysis on the gene expression, molecular characterization and in vitro proliferative activity of a recombinant preparation on primitive hematopoietic progenitor cells. *Hematol J* 2001;2(5):307-15.
- [148] Mio H, Kagami N, Yokokawa S, Kawai H, Nakagawa S, Takeuchi K, Sekine S, Hiraoka A. Isolation and characterization of a cDNA for human mouse, and rat full-length stem cell growth factor, a new member of C-type lectin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249(1):124-30.
- [149] Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 2004;186(2):134-44.
- [150] Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Geant A, Beaucourt S, Duflaut D, Besse S, Susini L, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(43):15364-9.
- [151] Smith-Beckerman DM, Fung KW, Williams KE, Auersperg N, Godwin AK, Burlingame AL. Proteome changes in ovarian epithelial cells derived from women with BRCA-1 mutations and family histories of cancer. *Mol Cell Proteomics* 2004.
- [152] Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, Ouatas T, Pluk H, Jespersen S, Vogels J, Verhoeckx K, Groten J, van Ommen B. Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2. *Biochim Biophys Acta* 2003;1650(1-2):73-91.
- [153] Arcuri F, Papa S, Carducci A, Romagnoli R, Liberatori S, Riparbelli MG, Sanchez JC, Tosi P, del Vecchio MT. Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. *Prostate* 2004;60(2):130-40.
- [154] Bommer UA, Thiele BJ. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(3):379-85.
- [155] Langdon JM, Vonakis BM, MacDonald SM. Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta). *Biochim Biophys Acta* 2004;1688(3):232-6.
- [156] Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics* 2005.
- [157] Arai K, Nakano H, Shibutani M, Naoi M, Matsuda H. Expression of class II beta-tubulin by proliferative myoepithelial cells in canine mammary mixed tumors. *Vet Pathol* 2003;40(6):670-6.

- [158] Grzanka A, Grzanka D, Orlikowska M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1611-7.
- [159] Hughes SA, Carothers AM, Hunt DH, Moran AE, Mueller JD, Bertagnolli MM. Adenomatous polyposis coli truncation alters cytoskeletal structure and microtubule stability in early intestinal tumorigenesis. *J Gastrointest Surg* 2002;6(6):868-74; discussion 75.
- [160] Armelin MC, Armelin HA. Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. *J Cell Biol* 1983;97(2):459-65.
- [161] Landen JW, Hau V, Wang M, Davis T, Ciliax B, Wainer BH, Van Meir EG, Glass JD, Joshi HC, Archer DR. Noscipine crosses the blood-brain barrier and inhibits glioblastoma growth. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):5187-201.
- [162] Roll DE, Murphy BJ, Laderoute KR, Sutherland RM, Smith HC. Oxygen regulated 80 kDa protein and glucose regulated 78kDa protein are identical. *Mol Cell Biochem* 1991;103(2):141-8.
- [163] Aoyama K, Burns DM, Suh SW, Garnier P, Matsumori Y, Shiina H, Swanson RA. Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005.
- [164] Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 2004;11(4):372-80.
- [165] Qian Y, Falahatpisheh MH, Zheng Y, Ramos KS, Tiffany-Castiglioni E. Induction of 78 kD glucose-regulated protein (GRP78) expression and redox-regulated transcription factor activity by lead and mercury in C6 rat glioma cells. *Neurotox Res* 2001;3(6):581-9.
- [166] Qian Y, Harris ED, Zheng Y, Tiffany-Castiglioni E. Lead targets GRP78, a molecular chaperone, in C6 rat glioma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;163(3):260-6.
- [167] Freyria AM, Ronziere MC, Boutillon MM, Herbage D. Effect of retinoic acid on protein synthesis by foetal bovine chondrocytes in high-density culture: down-regulation of the glucose-regulated protein, GRP-78, and type II collagen. *Biochem J* 1995;305 (Pt 2):391-6.
- [168] Lim YP, Wong CY, Ooi LL, Druker BJ, Epstein RJ. Selective tyrosine hyperphosphorylation of cytoskeletal and stress proteins in primary human breast cancers: implications for adjuvant use of kinase-inhibitory drugs. *Clin Cancer Res* 2004;10(12 Pt 1):3980-7.
- [169] Urushitani M, Kurisu J, Tateno M, Hatakeyama S, Nakayama K, Kato S, Takahashi R. CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *J Neurochem* 2004;90(1):231-44.
- [170] Furuta M, Kose S, Koike M, Shimi T, Hiraoka Y, Yoneda Y, Haraguchi T, Imamoto N. Heat-shock induced nuclear retention and recycling inhibition of importin alpha. *Genes Cells* 2004;9(5):429-41.
- [171] Castagna A, Antonioli P, Astner H, Hamdan M, Righetti SC, Perego P, Zunino F, Righetti PG. A proteomic approach to cisplatin resistance in the cervix squamous cell carcinoma cell line A431. *Proteomics* 2004;4(10):3246-67.

- [172] Brochu C, Haimeur A, Ouellette M. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite leishmania. *Cell Stress Chaperones* 2004;9(3):294-303.
- [173] Kabakov AE, Budagova KR, Bryantsev AL, Latchman DS. Heat shock protein 70 or heat shock protein 27 overexpressed in human endothelial cells during posthypoxic reoxygenation can protect from delayed apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 2003;8(4):335-47.
- [174] Yamamoto M, Ueno Y, Hayashi S, Fukushima T. The role of proteolysis in tumor invasiveness in glioblastoma and metastatic brain tumors. *Anticancer Res* 2002;22(6C):4265-8.
- [175] Fatma N, Kubo E, Chylack LT, Jr., Shinohara T, Akagi Y, Singh DP. LEDGF regulation of alcohol and aldehyde dehydrogenases in lens epithelial cells: stimulation of retinoic acid production and protection from ethanol toxicity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(2):C508-16.